



# **TESIS DE DOCTORADO**

## **Efectos de los isotiocinatos sobre modelos *in vitro* de cánceres hormonodependientes**

**M<sup>a</sup> Elena Pérez Muñuzuri**

**ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN  
CLÍNICA EN MEDICINA**

**SANTIAGO DE COMPOSTELA/LUGO**

**AÑO 2021**

## RESUMEN

El cáncer de próstata (CP) y de mama (CM) son cánceres heterogéneos en cuanto a su capacidad de respuesta a hormonas. La eficacia y los efectos adversos son las principales limitaciones del tratamiento de la quimioterapia convencional como el docetaxel (DOCE). El uso de agentes sensibilizantes podría mejorar la eficacia de los fármacos quimioterápicos y evitar dichas limitaciones.

Los productos de degradación de los glucosinolatos (GS) como los isotiocianatos, (ITCs) parecen ser los responsables de los efectos anticancerígenos de las Brásicas.

El objetivo general de esta tesis doctoral fue estudiar la eficacia antitumoral de diferentes compuestos presentes en vegetales del género Brassicaceae (SFN, I3C, PEITC, IB, AITC) solos o en terapia combinada con DOCE, en comparación con DOCE, en células de CM (MCF7, MDA-MB-231 y T47D) y CP (PC3, DU145) bajo condiciones in vitro.

Hemos utilizado líneas celulares derivadas de CP y de CM que reflejan la heterogeneidad molecular y clínica de estos cánceres, así como células sanas. Se ensayaron diferentes ITCs, a dosis crecientes, y se evaluó su eficacia terapéutica (antiproliferativa, proapoptótica, antimigratoria y mecanismos moleculares), como terapia única o coadyuvante con DOCE, a dosis previamente seleccionadas por carecer de toxicidad sobre células sanas.

Los ITCs mostraron efecto antitumoral célula-dependiente, tiempo-dependiente y/o concentración dependiente e incrementaron significativamente la eficacia de la terapia DOCE en células de CP y CM mediante el mecanismo de sensibilización, en dosis no tóxicas en células sanas de mama y próstata. Los cambios en la expresión génica derivados del tratamiento con ITCs en combinación con DOCE pueden explicar, al menos en parte, los efectos sensibilizantes frente al DOCE. Tomados en conjunto, nuestros resultados indican que los ITCs pueden ser compuestos prometedores como terapia coadyuvante en el CM y el CP.



D./Dña. **M<sup>a</sup> Elena Pérez Muñuzuri**

Título da tese: **Efectos de los isotiocinatos sobre modelos in vitro de cánceres hormodependientes**

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De ser o caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.
- 4) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide a versión impresa coa presentada en formato electrónico

E comprométome a presentar o Compromiso Documental de Supervisión no caso de que o orixinal non estea na Escola.

En **Santiago de Compostela, 23 de abril de 2021.**

**Sinatura electrónica**

## **AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR /TITOR DA TESE**

Efectos de los isotiocinatos sobre modelos in vitro de cánceres hormonodependientes

**D. Manuel Freire-Garabal Núñez**

**D. Manuel Macia Cortiñas**

**Dona. M<sup>a</sup> Elena Cartea González**

### **INFORMA/N:**

**Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por Dna. M<sup>a</sup> Elena Pérez Muñuzuri, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.**

**De acordo co indicado no Regulamento de Estudos de Doutoramento, declara tamén que a presente tese de doutoramento é idónea para ser defendida en base á modalidade de Monográfica con reprodución de publicacións, nos que a participación do/a doutorando/a foi decisiva para a súa elaboración e as publicacións se axustan ao Plan de Investigación.**

**En Santiago de Compostela, 23 de abril de 2021**



**Financiación:** Esta investigación se ha realizado en el marco del Plan Nacional I+D. Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. RTI2018-096591-B-100 financiado por *European Regional Development Funds* (FEDER); Plan Nacional I+D. Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2015-66256-C2-1-R) financiado por *European Regional Development Funds* (FEDER) y del Plan Nacional I+D. Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2013-35539) financiado por *European Regional Development Funds* (FEDER).



**Indicadores de calidad publicación:** “Glucosinolate-Degradation Products as Co-Adjuvant Therapy on Prostate Cancer in Vitro”.

- *International Journal of Molecular Sciences* (ISSN: 1422-0067)<sup>1</sup>.
  - Founded: 2000 (Volumes: 22).
  - 40,362 articles published so far.
  - 14410 articles have been cited 10 times or more.
- Peer review<sup>1</sup>
- Impact Factor<sup>1</sup>
  - Current Impact Factor: 5.923
  - 5-year Impact Factor: 6.132
  - **JCR** category rank: Q1: Biochemistry & Molecular Biology
- Editor Board: 29. Section Board for 'Molecular Oncology':146<sup>2</sup>
- Reviewer Board: 627<sup>2</sup>

<sup>1</sup> data as of 21 July 2021. <https://www.mdpi.com/journal/ijms/stats>

<sup>2</sup> data as of 21 July 2021. <https://www.mdpi.com/journal/ijms/editors>



**A mi padre**

## AGRADECIMIENTOS

Le contaré al lector por qué esta tesis está dedicada a mi padre. Mi padre representa la UNIVERSIDAD con mayúsculas y es que si alguien la ha querido, comprendido y amado es él. Muy brevemente le contaré que mi padre nació y se crió sin expectativas de un futuro educativo y que gracias a su valía y su perseverancia llegó a ser el catedrático más joven de este país. Desde que era muy pequeña, nos ha inculcado a mí y a mis hermanos, el amor por esta Institución, por la docencia y por la investigación y no puedo entender mi vida y la de mi padre sin estos pilares. Este amor por la ciencia no habría sido posible sin el tesón de mi madre, el gran pedestal de esta familia. Por fin conseguís con este trabajo, vuestro gran sueño de tener cuatro hijos doctores.

A mi marido, compañero de viaje desde hace casi 20 años, con el que tengo la familia más bonita del mundo, con nuestros 5 hijos. Este trabajo de tesis se empezó a fraguar hace 15 años, el mismo tiempo que tiene nuestro hijo mayor. Sin vuestra comprensión, por las horas perdidas, esto hubiera sido mucho más difícil. Gracias cariño por ponerlo siempre fácil y por entenderme.

El Dr. Macía es uno de los directores de esta tesis y aunque le agradezco su labor en la consecución de este trabajo, prefiero utilizar este medio para expresarle mi verdadero agradecimiento por ser mi mentor. Según la RAE mentor significa maestro, él fue mi profesor en la facultad y a través de sus explicaciones surgió en mí el interés y el gusto por esta disciplina médica; significa guía o consejero y lo es, ante cualquier duda o dificultad siempre acudo a sus consejos, no solo en lo que respecta a lo profesional sino también en lo personal; significa padrino, aunque no lo es de ninguno de mis hijos, bien

podiera haberlo sido, pero sí ha estado presente en casi todos mis momentos profesionales de importancia. Así que nuevamente estás conmigo en un nuevo paso de mi carrera profesional, por lo que quiero agradecerte esta compañía. Como dicen en mi tierra, ¡gracias maestro! .

Al Dr.Manuel Freire-Garabal lo conocí hace ya más de 6 años y una de las cosas que más me gustó de él es lo buena gente que parecía y es que a medida que han pasado los años esta primera impresión se ha ido consolidando hasta tener en él a un buen amigo. La verdad es que ha sido estupendo trabajar bajo tu tutela.

Elena Cartea y yo hemos tenido menos relación en la elaboración de esta tesis, pero sí sé de su generosidad para la consecución de este proyecto, así que gracias por ello.

Dra. M<sup>a</sup> Jesús Núñez Iglesias (Chus), eres sin duda la piedra angular de esta tesis, pero al igual que con el Dr. Macía voy a utilizar este medio para expresarte por un lado mi agradecimiento por enseñarme a estas alturas de mi vida el mundo del laboratorio, tan ajeno para los que nos dedicamos a la labor asistencial y, por otro, y fundamentalmente, porque me has acogido bajo tu ala en el mundo de la Universidad y esto ha hecho que aparezca entre nosotras una preciosa amistad que espero vaya mucho más allá de este trabajo.

Algo parecido me ha sucedido con Dra. Silvia Novio Mallón y Carla, García Santiago compañeras en el laboratorio, quienes han tenido una paciencia inmensa conmigo y que gracias a sus explicaciones he podido participar en los experimentos que se relatan en este trabajo.

Gracias a todos por tanto, por permitirme alcanzar este sueño, que fue inicialmente de mi padre y que hice mío. Gracias.

## INDICE

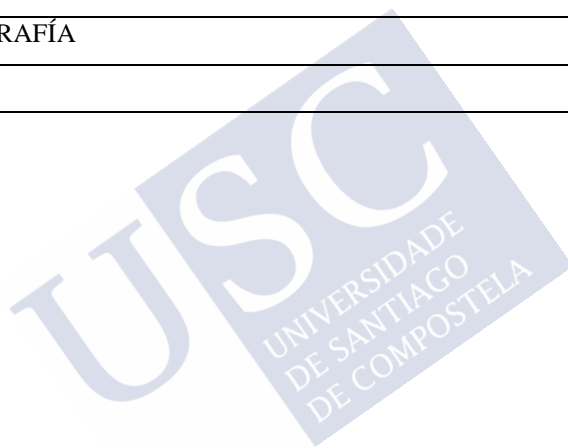
1.INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cánceres hormonodependientes	3
1.1.1. CM: Tipos e indicaciones terapéuticas	3
1.1.2. CP: Tipos e indicaciones terapéuticas	10
1.2. Moléculas de origen natural: La familia <i>Brassicaceae</i>	14
1.3. Efectos de los productos de hidrólisis de los GS en los canceres hormonodependientes	17
1.3.1. Mecanismos moleculares	19
1.3.1.1. Actividad epigenética	19
1.3.1.2. Actividad antiproliferativa	24
1.3.1.3. Actividad apoptótica	32
1.3.1.4. Actividad autofágica	39
1.3.1.5. Actividad antimetastática	40
1.3.1.6. Actividad antiangiogénica	46
2. JUSTIFICACIÓN	47
2.1. ¿Cómo y por qué realizamos el estudio?	47
2.1.1. Líneas celulares ensayadas	47
2.1.2. Moléculas ensayadas	49
2.2. Justificación del uso de DOCE	50
3.OBJETIVOS	52
3.1. Objetivo general	52
3.2. Objetivos específicos	52
4.MATERIAL Y MÉTODO	53
4.1. Líneas celulares	53
4.1.1. Líneas celulares sanas	54
4.1.2. Líneas celulares de CM	55



4.1.2.1. MCF7	55
4.1.2.2. T47D	56
4.1.2.3 MDA-MB-231	56
4.1.3. Líneas celulares de CP	57
4.1.3.1. PC3	57
4.1.3.2. DU145	58
4.2. Condiciones y medios de cultivo	59
4.3. Tratamientos	59
4.4. Ensayo de citotoxicidad	60
4.5. Sensibilización frente al doce	60
4.6. Ensayo de formación de colonias	60
4.7. Ensayo de apoptosis	60
4.8. Ensayo de migración	61
4.9. Cambios citopáticos	63
4.10. Técnica de RT-qPCR	64
4.11. Análisis estadístico	66
5. RESULTADOS	67
5.1. Resultados del objetivo específico 1): estudiar la actividad anti proliferativa de SFN, AITC, PEITC, IB e I3C, con y sin DOCE, sobre células de CM y de CP.	68
5.1.1. CM	68
5.1.2. CP	79
5.2. Resultados del objetivo específico 2): Estudiar el efecto de los ITCs sobre la sensibilización al DOCE en células de CM y de CP.	84
5.2.1. CM	84
5.2.2. CP	84
5.3. Resultados del objetivo específico 3): Establecer la actividad anticlonogénica de los ITCs estudiados, con y sin doce, sobre las células	85

de CM y de CP	
5.3.1. CM	85
5.3.2. CP	89
5.4. Resultados del objetivo específico 4): establecer la actividad apoptótica de los ITCs estudiados, con y sin doce, sobre células de CM y de CP.	90
5.4.1. CM	90
5.4.2.CP	93
5.5. Evaluar la actividad citopática de los ITCs estudiados, con y sin DOCE, sobre células de CM y de CP.	94
5.5.1. CM	94
5.5.2.CP	94
5.6. Para el objetivo específico 6): Evaluar la actividad antimigratoria de los ITCs estudiados sobre células de CM y de CP	95
5.6.1. CM	95
5.6.2. CP	96
5.7 Explorar mecanismos de acción que justifiquen posibles efectos de estas moléculas sobre la actividad proliferativa, apoptótica y antimigratoria de estas células tumorales así como la sensibilización a los efectos del doce y la expresión del fenotipo celular, mediante la técnica RT-qPCR.	97
5.7.1. CM	97
5.7.2.CP	100
6.DISCUSIÓN	102
6.1. Inhibición de la actividad proliferativa	105
6.2. Efecto sensibilizante de ITCs frente al DOCE	110
6.3. Efecto apoptótico	116
6.4. Actividad citopática	119

6.5.Actividad antimigratoria	120
6.6. Mecanismos de acción que justifiquen posibles efectos ITCs sobre la actividad proliferativa, apoptótica y antimigratoria de estas células tumorales así como la sensibilización a los efectos del doce y la expresión del fenotipo celular	122
6.6.1.p21	122
6.6.2. BAX y Bcl2	123
6.6.3. CYP3A4	125
7.CONCLUSIONES	129
8.BIBLIOGRAFÍA	131
9.ANEXOS	176



## INDICE DE TABLAS

Tabla1: Tipos subrogados de cáncer de mama.	3
Tabla 2: Clasificación de la OMS del cáncer de mama.	4
Tabla 3: Productos de hidrólisis de los GS. Moléculas.	16
Tabla 4: Mecanismos epigenéticos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	23
Tabla 5: Efectos de I3C en el ciclo celular.	29
Tabla 6: Efectos de los ITCs <i>in vivo</i> sobre el ciclo celular en modelos de CP.	31
Tabla 7: Efectos de los ITC en EMT en CM.	44
Tabla 8. Características de las células sanas epiteliales de mama (HMEC, PCS-600-010) y de próstata (PCS-440-010)	54
Tabla 9. Características de las líneas celulares cancerígenas usadas en este estudio.	58
Tabla 10. Cebadores empleados en RT-q-PCR.	65

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de GS y productos de hidrólisis.	14
Figura 2: Mecanismos de acción antiproliferativos y apoptóticos de I3C.	36
Figura 3: Efectos de los ITC en la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis en células de CM.	38
Figura 4. Mecanismos de carcinogénesis sobre los que se ha estudiado el efecto de las moléculas ensayadas.	50
Figura 5. Sembrado celular en los insertos de placas de 24 pocillos.	62
Figura 6. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con SFN sobre la proliferación de células MCF7.	70
Figura 7. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con SFN sobre la proliferación de células T47D.	71
Figura 8. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con SFN sobre la proliferación de células MDA-MB-231.	72
Figura 9. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con AITC sobre la proliferación de células MCF7.	73
Figura 10. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con AITC sobre la proliferación de células T47D.	74
Figura 11. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con AITC sobre la proliferación de células MDA-MB-231	75
Figura 12. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con PEITC sobre la proliferación de células MCF7.	76
Figura 13. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con PEITC sobre la proliferación de células T47D.	77

Figura 14. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con PEITC sobre la proliferación de células MDA-MB-231.	78
Figura 15. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con SFN.	80
Figura 16. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con AITC	81
Figura 17. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con PEITC.	82
Figura 18. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con IB.	83
Figura 19. Efecto del SFN sobre la actividad clonogénica de células MCF7 y T47D (% de clones viables en relación al control).	87
Figura 20. Efecto de los tratamientos sobre la actividad clonogénica de células MDA-MB-231 (% de clones viables en relación al control).	88
Figura 21. Efecto de los tratamientos sobre la actividad clonogénica de células de CP (% de clones viables en relación al control).	89
Figura 22. Cuantificación de células apoptóticas MCF7.	91
Figura 23. Cuantificación de células apoptóticas de CP PC3 y D145.	92
Figura 24. Inhibición de la migración celular de células MCF7.	95
Figura 25. Inhibición de la migración celular de células de CP.	96
Figura 26. Efecto del SFN, DOCE o de la terapia combinada de DOCE+SFN sobre la expresión génica ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) de BAX, p21, MRP1, CYP3A4, Topo II $\alpha$ en células MCF7.	99
Figura 27. Efecto del SFN, DOCE o de la terapia combinada de DOCE+SFN sobre la expresión génica ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) de BAX, p21, MRP1, CYP3A4, Topo II $\alpha$ en células PC3.	100
Figura 28. Mecanismos potenciales para explicar el efecto sinérgico de la combinación de ITCsy DOCE en células de CP y de CM.	115

## ABREVIATURAS

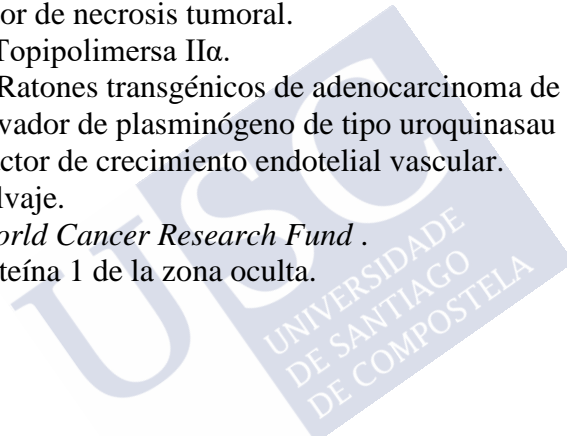
4E-BP1: Proteína de unión del regulador 4E 1.  
ACS: *American Cancer Society*.  
AD: Andrógeno dependiente.  
ADN: Ácido Desoxirribonucleico.  
AECC: Asociación Española Contra el cáncer.  
Ahr:receptor de hidrocarburo de arilo.  
AI: Andrógeno insensible.  
AICR: *American Institute for Cancer Research*.  
AITC: Allyl isotiocianato.  
AME: Actina de músculo liso.  
ARN: Ácido Ribonucleico.  
Balb/c: Raza de ratones de laboratorio albinos.  
BAX: *BCL-2-associated X protein*.  
Bcl2: Proteína de la familia del linfoma de células B 2.  
Bim: Mediador de muerte celular de linfomade células B tipo2  
BITC: Benzyl isotiocianato.  
BRCA1: *Breast Cancer1*, gen supresor.  
BRCA2: *Breast Cancer2*, gen supresor.  
CAV1: Caveolin 1.  
Cdc25C: Gen que codifica la fosfatasa 3 inductora de fase M.  
CDKs: Quinasas dependientes de ciclina.  
CHAARTED: Ensayo clínico *Chemohormonal Therapy Versus Androgen Ablation Randomized Trial for Extensive Disease in Prostate Cancer*.  
CK18: Citoqueratina 18.  
CM: Cáncer de mama.  
CMC: Células madre mamarias cancerígenas.  
c-Myc: Protoncogén c myc.  
cox-2: Cyclooxygenasa-2.  
CP: Cáncer de próstata.  
CRCP: Cáncer de próstata resistente a la castración.

CSC: Células madre cancerosas.  
 CSIC: Centro Superior de Investigaciones Científicas.  
 CTet: 1-bencil-indol-3-carbinol  
 CTr: 5,6,11,12,17,18-hexahidrociclonona [1,2-b: 4,5-b': 7,8-b''] triindol)  
 CYP1A: Citocromo p401A  
 CYP1B: Citocroma p4501B  
 CYP3A4: Citocromo p3A4  
 DIM: Diindolilmetano, (producto de condensación de I3C)  
 DNAMT: DNA metil transferasa  
 DNMT1: DNA metiltransferasa 1  
 DNMT3B: DNA metiltransferasa 3B  
 DOCE: Docetaxel  
 Drp1: *Dinamin related protein*.  
 E2: Estradiol  
 EAU: *Euroepan Urology Association*  
 EGF: Factor de crecimiento epidérmico  
 EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico  
 EMT: Transición epitelial mesenquimal  
 EPIC: *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*  
 ESMO: *European Society of Medical Oncology*.  
 GnRh: Hormona liberadora de Gonadotrofinas.  
 GSH: Glutation  
 GSL: Glucosinolatos  
 GSTP1: Enzima desintoxicante de fase II glutatión-S-transferasa de clase  $\pi$  1  
 HDAC: Histona deacetilasa  
 Her 2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano  
 HSP: Proteínas de choque térmico.  
 hTERT: Transcriptasa inversa de la telomerasa humana  
 I3C: Indol 3 carbinol  
 IA: Inhibidores de aromatasa  
 IB: Iberina  
 ICD-O: *International classification of diseases for oncology*.  
 IFN  $\gamma$ : Interferón gamma



IGF1R: Receptor 1 del factor de crecimiento tipo insulina.  
IL-6: Interleuquina 6.  
IRS1: Receptor de insulina sustrato-1.  
ITC: Isotiocianatos.  
LC3: Proteína 1 de la cadena ligera asociada a los microtúbulos 3.  
mCRPC: Cáncer de próstata metastático resistente a la castración.  
mCRPC: CP metastático resistente a la castración.  
MicroRNAs: miR-23b, miR-92b, miR-381 and miR-382.  
MMP: Metaloproteinasas.  
MMTV: Ratones con virus de tumor mamario.  
MOMP: Membrana externa mitocondrial.  
MRP1: *Multidrug resistance-associated protein 1*.  
NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*.  
NF-KB: Factor nuclear Kappa.  
OMS: Organización Mundial de la Salud.  
OMS: Organización Mundial de la Salud.  
P16: Gen o proteína supresora p16.  
p21/WAF1: Cyclina-dependiente de quinasa inhibidor 1.  
P53: Gen o proteína p53.  
Pan-Can: *NanoString Pan Cancer Pathways panel*.  
PAR: receptor de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa.  
PARP: Poli ADP ribosa polimerasa.  
PEITC: Fenetil isotiocianato.  
PEITC-NAC: Conjugado de N-acetilcisteína de isotiocianato de fenetilo.  
PLK-1: *polo-like kinase .1*  
PSA: Antígeno prostático específico.  
PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa.  
PUMA: Modulador de la apoptosis inducido por p53.  
RA: Receptores de andrógenos.  
RAn: Receptor nuclear de andrógenos.  
RAR $\beta$ 2: Receptor  $\beta$ 2 del ácido retinoico.  
RE: Receptores de estrógenos.  
RE-: Sin receptores de estrógenos.  
RE+: Con receptores de estrógenos.  
RE $\alpha$ : Subunidad  $\alpha$  del receptor estrogénico.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.  
RP: Receptores de progesterona.  
RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Transcriptasa.  
inversa. En tiempo real.  
SEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia.  
SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica.  
SEOQ: Sociedad Española de Oncología Quirúrgica  
SERM: Modulador selectivo de los receptores de estrógenos.  
SFN: Sulforrafano.  
Sp1: Factor de transcripción Sp1.  
Src: Tiroquinasa Src.  
TNF: Factor de necrosis tumoral.  
TopoII $\alpha$ : Topipolimersa II $\alpha$ .  
TRAMP: Ratones transgénicos de adenocarcinoma de próstata.  
uPA: Activador de plasminógeno de tipo uroquinasau  
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.  
w:Tipo salvaje.  
WCRF:*World Cancer Research Fund* .  
ZO-1: Proteína 1 de la zona oculta.



## 1.INTRODUCCIÓN

En tanto que esta tesis doctoral trata sobre nuevas terapias en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer hormodependientes, en este apartado se realiza el abordaje de los mismos.

El cáncer de mama (CM) constituye una enfermedad con gran repercusión social, económica y sanitaria (Ades et al., 2014).

No sólo es el cáncer más frecuente en mujeres, a excepción de los cánceres de piel no melanomas, sino que también lo es en la población general. Cada año aparecen más de 2 millones de casos nuevos al en el mundo, lo que supone el 25 % de todos los cánceres. Es también el cáncer más frecuente independientemente del grado de desarrollo del país *Global Cancer Observatory* [(GLOBOCAN), 2020].

Según los últimos datos disponibles (GLOBOCAN 2020, SEOM, 2021) el CM es el tumor más prevalente en España, entendiendo como prevalencia el número de pacientes diagnosticados de un tipo de tumor y que siguen vivos a los 5 años.

De acuerdo con los datos proporcionados por el INE (Instituto Nacional de Estadística) en 2019, el CM es la primera causa de muerte por tumores en mujeres. En España fallecen unas 6000 mujeres al año por CM, lo que representa el 16,7% de todos los fallecimientos por cáncer del sexo femenino en nuestro país, y el 3,3% del total de muertes entre las mujeres [Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), 2021).

Las predicciones indican, según la SEOM (2021), que el número de tumores aumentará en las próximas décadas; no sólo por el incremento de la esperanza de vida, (se espera que 1 de cada 2

hombres y 1 de cada 3 mujeres tengan un cáncer a lo largo de su vida) sino también por el mayor impacto de los factores de riesgo de la mayoría de los tumores como el alcohol, la obesidad, el tabaco, etc. Se considera que cinco son los factores de riesgo evitables, y que producen más muertes a nivel mundial: el tabaco, las infecciones, el alcohol, el sedentarismo y las dietas inadecuadas (GLOBOCAN, 2020, SEOM, 2021).

La supervivencia de este cáncer mejora en España un 1,4% cada año, siendo la supervivencia global a los 5 años de un 82,2%, similar a los mejores datos de otros países en Europa y superior a la media europea [Registro Europeo del Cáncer (EUROCARE-5)]. Los datos proporcionados por la SEOM en 2021 indican una supervivencia a los 5 años del 86% (mujeres diagnosticadas entre 2008 y 2013).

El CM es el tercer tipo de cáncer que supone más gasto sanitario en nuestro país, por detrás del de colon y pulmón. El gasto sanitario en cáncer se ha relacionado directamente con la supervivencia e inversamente con la incidencia (Ades et al., 2014).

El cáncer de próstata (CP) es el cáncer más frecuente en hombres sin contar los tumores de piel, según la *American Society of Clinical Oncology* (ASCO, 2021). Por otra parte, es el cuarto cáncer en número de casos en el mundo en ambos sexos (GLOBOCAN, 2021).

Más del 60 % de los CP son diagnosticados en mayores de 65 años. El 90% de los casos se detecta en estadios iniciales en donde la tasa de supervivencia a los 5 años es de casi el 100% (ASCO, 2021). En general, de acuerdo con la Asociación Española Contra el Cáncer, el 84,6% de las personas diagnosticadas de CP sobreviven a los 5 años. Este dato no tiene en cuenta ni la edad, ni el estadio, ni otros factores condicionantes. Así mismo, es la octava causa de muerte en el mundo y la quinta entre los varones. En España es el tercer tipo de cáncer que provoca más muertes, tras el de pulmón y el colorrectal. Por otra parte, en nuestro país fallecen más de 6000 hombres al año por su causa, representando el 9% de todas las muertes por cáncer en el sexo masculino y el 2,8% de todas las muertes en general de los hombres (AECC, 2021).

Desde el empleo de los niveles del antígeno prostático específico (PSA) en sangre como método de cribado del CP la incidencia de este tumor ha aumentado debido al lógico aumento de los diagnósticos, pero también la supervivencia [*Euroepan Urology Association* (EAU, 2010)]

## 1.1. CÁNCERES HORMONODEPENDIENTES

### 1.1.1. CM: Tipos e indicaciones terapéuticas

El CM puede ser clínicamente evidente, ya sea como nódulo palpable en la mama o como adenopatía palpable en la axila o como secreción anómala por pezón, o puede ser subclínico siendo diagnosticado en pruebas de cribado (Oncoguía SEGO, 2017).

En el año 2000 se definieron 4 tipos moleculares o subrogados diferentes del CM, con comportamientos en su pronóstico y hacia los tratamientos distintos. Estos tipos y sus diferencias se muestran en la tabla 1.

Tabla1. Tipos subrogados de CM

	RE	RP	Her 2	Ki-67
Luminal A-Like	+	$\geq 20\%$	-	Bajo $<20\%$
Luminal B- Like	+	$<20\%$	-	Alto $>20\%$
	+	+/-	+	
Basal Like	-	-	-	
Her 2-neu sobrepresado	-	-	+	

Elaboración propia. Fuente: Oncoguía SEGO, 2017. Abreviaturas: RE: receptores de estrógenos, RP: receptores de progesterona, Her 2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano; +, positivo; -, (-).

En cuanto a los tipos histológicos, persiste la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2012, aunque con modificaciones en la última publicación de 2020 (Ver Tabla 2), pero ha sido claramente superada en la toma de decisión terapéutica por el tipo subrogado, los factores pronósticos (RE, RP, HER2 y Ki-67) y los estudios de extensión.

Tabla 2. Clasificación OMS de CM.

Tipo	Subtipo		
Tumores epiteliales	Carcinoma microinvasivo		
Carcinoma invasivo	Carcinoma NST (no special type)	Carcinoma pleomórfico	
		Carcinoma con células gigantes estromales similares a osteoclastos	
		Carcinoma con características criocarcinomasas	
		Carcinoma con características melanóticas	
	Carcinoma Lobular Invasivo	Carcinoma lobular clásico	
		Carcinoma Lobular Sólido	
		Carcinoma Lobular Alveolar	
		Carcinoma Lobular Pleomórfico	
		Carcinoma Tubulolobular	
		Carcinoma Lobular Mixto	
	Carcinoma Tubular		
	Carcinoma Cribiforme		
	Carcinoma Mucinoso		
	Carcinoma con características medulares	Carcinoma medular	
		Carcinoma Medular Atípico	
		Carcinoma Invasivo NST con características medulares	
	Carcinoma condiferenciación apocrina		
	Carcinoma en anillo de sello		
	Carcinoma micropapilar		
	Carcinoma metaplásico	Carcinoma metaplásico con diferenciación mesenquimal	Carcinoma adenoescamoso de bajo grado
			Carcinoma metaplásico tipo fibromatoso
			Carcinoma de células escamosas
			Carcinoma de células “spindle”
			Diferenciación condral
			Diferenciación ósea
			Otros tipos de diferenciación mesenquimal
		Carcinoma mixto metaplásico	
	Carcinoma mioepitelial		

Cont. Tabla 2

Cont. Tabla 2			

Cont. Tabla 2

Lesiones papilares	Papiloma intraductal	Con hiperplasia atípica
		Con carcinoma ductal <i>in situ</i>
		Con carcinoma lobulillar <i>in situ</i>
	Carcinoma papilar intraductal	
	Carcinoma papilar encapsulado	Con invasión
	Carcinoma papilar sólido	In situ
Invasivo		
Proliferaciones epiteliales benignas	Adenosis esclerosante	
	Adenosis apocrina	
	Adenosis microglandular	
	Cicatriz radial/ lesión esclerosante compleja	
	Adenomas	Tubular
		De lactancia
Apocrino		
Ductal		
Tumores mesenquimales	Fascitis nodular	
	Miofibroblastoma	
	Fibromatosis tipo desmoide	
	Tumor inflamatorio miofibroblástico	
	Lesión vascular benigna	Hemangioma
		Angiomatosis
		Lesión vascular atípica
	Hiperplasia estroma pseudoangiomatosa	
	Tumor de células granulares	
	Tumores benignos de la vaina del nervio periférico	Neurofibroma
		Schwanoma
	Lipoma	Angiomiolipoma
	Liposarcama	
	Angiosarcoma	
	Rabdomiosarcoma	
	Ostosarcoma	
	Leiomioma	
	Leiomiosarcoma	
	Tumores fibroepiteliales	Fibroadenoma
Tumor Phyllodes		Benigno
		Maligno
		Borderline
		Tumor estromal periductal de bajo grado
Hamartoma		



Cont. Tabla 2		
Tumores del pezón	Adenoma del pezón	
	Adenoma siringomatoso	
	Enfermedad de Paget del pezón	
Linfoma maligno	Linfoma de células B difuso	
	Linfoma de Burkitt	
	Linfoma de células T	Linfoma de células anaplásicas. ALK negativas
	Linfoma tipo MALT de células B de la zona marginal extranodal	
	Linfoma folicular	
Tumores metastásicos		
Tumores de mama del varón	Ginecomastia	
	Carcinoma	Invasivo
		In situ
Presentaciones clínicas	Carcinoma inflamatorio	
	Carcinoma bilateral de mama	

Elaboración propia. Fuente: Tan, 2020; Sinn & Kreipe, 2013.

El tratamiento actual del cáncer del CM pasa por la cirugía, ya sea conservadora, radical con mastectomía completa y/o con linfadenectomía o la utilización de la técnica de ganglio centinela. En ocasiones, como paso previo a estas técnicas, se usarán tratamientos neoadyuvantes y, en otras, estos tratamientos se harán con posterioridad.

Los tratamientos actuales persiguen la terapia cada vez más personalizada en función de los factores predictores de respuesta a quimioterapia y radioterapia. Para lo primero son el alto grado histológico, los receptores hormonales (-)s, la elevada proliferación tumoral ( $Ki\ 67 > 20-30\%$ ), la sobreexpresión de Her 2 y el infiltrado inflamatorio. Para lo segundo, son el bajo grado histológico, la alta expresión de receptores hormonales, el Her 2 (-), la baja proliferación tumoral y el  $Ki\ 67 < 20-30\%$  (Oncoguía SEGO, 2017).

En algunos tipos de cáncer luminal A y B *like* se aconseja el uso de plataformas génicas, que definen el perfil de expresión génica del tumor y en base a ello la indicación o no de quimioterapia. Estos paneles génicos surgieron de la necesidad de decidir qué pacientes se beneficiarían realmente de la quimioterapia y cuáles no, ya que se ha

llegado a un punto en que más de la mitad de los tumores son receptores hormonales positivos y con ganglios axilares negativos. Las pacientes con estos tumores, a nivel mundial, se estaban beneficiando del uso de la quimioterapia, aunque también estaban padeciendo, muchas de ellas innecesariamente, sus efectos secundarios. Estos paneles génicos, de los cuales hay varios en el mercado, puntúan el pronóstico de cada caso; habiendo protocolizado la puntuación obtenida en ese panel a partir de la cual se considera que los beneficios de la quimioterapia superan a los riesgos (Sparano et al., 2018).

Los agentes quimioterápicos más utilizados en el CM son las antraciclinas y los taxanos (DOCE y paclitaxel). Su uso suele prolongarse por 5 ó 6 meses, durante los cuales puede haber efectos secundarios. Las antraciclinas son fundamentalmente cardiotóxicas y los taxanos centran su toxicidad a nivel de neuropatía distal, hematológica y ungueal (Oncoguía SEGO, 2017).

Cuando existen receptores hormonales positivos se aconseja asociar tratamiento hormonal (fundamentalmente si hay más de un 10% de RE). Estos medicamentos son los moduladores selectivos de receptores de estrógeno (SERM), de los cuales el más utilizado es el tamoxifeno; los IA (inhibidores de la aromatasa) que por su estructura se clasifican en no esteroideos (anastrozol y letrozol) y esteroideos (exemestano); y los supresores de la función ovárica (agonistas de GnRh) (hormona liberadora de gonadotrofinas), siendo el más utilizado la goserelina. Actualmente este tratamiento se aconseja entre 5 y 10 años. Estos fármacos al igual que los quimioterápicos, tienen efectos secundarios siendo las toxicidades fundamentales del tamoxifeno el incremento del riesgo tromboembólico y de cáncer de endometrio, mientras que las de los IA son artralgias, osteoporosis, aumento del riesgo cardiovascular y trastornos cognitivos (Oncoguía SEGO, 2017; NCCN guidelines, 2021).

Entre un 10 y un 15% de los CM sobreexpresan el receptor Her 2. Esto les conferiría un peor pronóstico y una menor supervivencia hasta el descubrimiento del anticuerpo monoclonal humano llamado Trastuzumab, que produce un bloqueo selectivo de este receptor

inhibiendo así la proliferación celular. Se administra por vía parenteral o subcutánea a lo largo de un año. Su toxicidad fundamental es a nivel cardiovascular, suponiendo una disminución de la fracción de eyección que cesa al finalizar el tratamiento. Es por este motivo por el que se evita su uso concomitante con las antraciclinas (Oncoguía SEGO, 2017; NCCN *guidelines*, 2021).

Existen varias indicaciones para el uso de radioterapia en el tratamiento del CM, la más común es tras una cirugía conservadora de mama, disminuyendo el riesgo de una recidiva local, comenzando no más allá de 7 meses postcirugía si hay quimioterapia asociada o tras la cicatrización completa si no hay quimioterapia. Otros usos también son la irradiación tras mastectomía en pacientes de alto riesgo o de la cadena axilar (en casos seleccionados). Esta técnica tampoco está exenta de riesgos siendo los cambios a nivel cutáneo y el cansancio los más frecuentes (Oncoguía SEGO, 2017).

Aunque el presupuesto de investigación en tratamientos oncológicos se ha incrementado en 10 veces en los últimos 35 años (4.000 millones en el año 1975 versus 40.000 millones en el año 2009) esto, no ha supuesto un aumento en el número de fármacos útiles para el tratamiento del CM. Así, existían 26 nuevos agentes quimioterápicos que fueron creados en el año 1976 frente a 27 en 2013 (Hait, 2010). Además, hoy en día, tanto en EEUU como en la UE el desarrollo de nuevos fármacos supone un tiempo superior a lo que antes; en los años 90 se tardaba de media 9,7 años en la realización de ensayos correspondientes para el estudio de un fármaco y ser usado en la práctica clínica frente a 13,9 años a partir del año 2000 (Shim & Liu, 2014).

Se hace necesario el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento del CM no sólo para reducir los efectos secundarios, sino también para encontrar quimioterápicos para sustituir a los clásicos cuando las células tumorales se vuelven resistentes a ellos. En esta búsqueda volvemos la mirada hacia las moléculas de origen vegetal, con una actividad en ocasiones superior a los de origen sintético (Monks et al. 2011). También tenemos que pensar en la dieta, ya que

numerosos estudios la han relacionado con el cáncer, ya sea como factor de riesgo o como factor protector, según sea el tipo de dieta (Velie et al., 2005; Jane et al., 2007; Lopez-Guarnido et al., 2014; Cade et al., 2011). Dentro de los estudios sobre la dieta y el cáncer, merece mención especial, el EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*), que se inició en el año 1992 y recabó información sobre cientos de miles de pacientes en 12 países de Europa. De dicho estudio se han derivado diferentes publicaciones. Cabe destacar algunos, como el que vincula la dieta rica en vegetales y fruta con un menor riesgo de CM, fundamentalmente el triple (-) (TN) (Emaus et al., 2016). Otros factores analizados incluyen el hábito tabáquico (activo y pasivo), sobre todo en los años entre la menarquía y el primer embarazo (Dossus et al., 2015) o el síndrome metabólico (caracterizado por obesidad, aumento de glucosa en sangre, aumento de LDL, de triglicéridos y de la tensión arterial (Agnoli et al., 2015).

El *World Cancer Research Fund* (WCRF) y la *American Cancer Society* (ACS) incluyen entre sus recomendaciones para la prevención del cáncer mantener un peso saludable, realizar al menos 150 minutos de ejercicio moderado a la semana, limitar el consumo de alcohol y mantener una dieta con abundantes vegetales (Harvie et al., 2015). Es por tanto necesario el estudio sobre la dieta y moléculas obtenidas de vegetales para la creación de nuevos quimioterápicos.

### **1.1.2. CP: Tipos e indicaciones terapéuticas**

El CP tiene varios factores de riesgo claramente estudiados. El más evidente es la edad, siendo más frecuente a mayor edad. El segundo es la raza, siendo los afroamericanos los más propensos a padecerlo. El tercero es la herencia; el 10% de los tumores de próstata tienen un componente hereditario. Seguir una dieta rica en grasas y ser portador de genes como el *Breast Cancer-1* (BRCA-1) y BRCA-2 también suponen un riesgo aumentado (EAU, 2010).

En cuanto al diagnóstico precoz de CP, método más usado de cribado es el PSA, aunque es un tema controvertido. Casi el 40% de

los hombres de más de 60 años tienen focos tumorales en su próstata y sin embargo en más del 95% de estos la causa de su muerte no será el CP. Por lo tanto y dada la controversia del tema actualmente en España no existe un cribado universal del CP (AECC, 2021). De hacer este cribado *European Urology Association* (EUA) recomendaría una determinación basal del PSA a los 40 años de edad, a partir de ahí, y cada 8 años se repetiría la determinación siempre que la primera sea inferior a 1ng/ml. En los mayores de 75 años no se realizarían más determinaciones de PSA si su valor basal es inferior a 3 ng/ml por el riesgo muy bajo de fallecer por esta causa (EAU, 2010).

La gran mayoría de los CP son adenocarcinomas, siendo los tipos menos frecuentes los adenocarcinomas de los ductos prostáticos, los adenocarcinomas mucinosos, los carcinomas transicionales y los carcinomas de célula pequeña o neuroendocrinos (SEOM, 2021).

En el estadiaje TNM del CP se utilizan tanto los niveles de PSA como los grados de Gleason. La puntuación de Gleason se realiza a partir de material de biopsia y hace referencia a los 2 patrones más frecuentes de crecimiento tumoral observados, siendo la mejor puntuación un 2 y la peor puntuación un 10. Tanto el valor de la PSA como el Gleason son factores pronósticos (EAU, 2010; SEOM, 2021).

Existen varias opciones terapéuticas en CP:

- Actitud expectante, “tratamiento diferido” o “guiado por los síntomas”: hace referencia al tratamiento conservador en varones ancianos con otras comorbilidades y con esperanza de vida escasa en donde dada la larga progresión de la enfermedad hace no recomendables otros tratamientos (EAU, 2010).
- Vigilancia activa: en este caso no se abandona el tratamiento curativo, sólo se postpone, y mientras tanto se realiza un seguimiento estrecho mediante análisis de PSA y eventuales biopsias. Para poder optar a esta opción sería adecuado un estadio clínicamente limitado, niveles de PSA < de 15-20

ng/ml y puntuaciones de Gleason en biopsias inferiores a 7 (SEOM, 2021).

- Tratamiento quirúrgico: prostatectomía radical. Se entiende la extracción de la próstata desde la vejiga a la uretra con ambas vesículas seminales y tejido suficiente de alrededor hasta tener bordes (-)s. Se realizará de forma eventual una lindenectomía pélvica bilateral. El objetivo de este tratamiento es eliminar la enfermedad, manteniendo la continencia del paciente y su potencia sexual, para lo que se realizará preservación nerviosa en la medida de lo posible. Estos dos signos son las complicaciones más frecuentes de la cirugía, siendo en la mayoría de los casos pasajeras tras el tratamiento (EAU, 2010).
- Radioterapia: ya sea externa o braquiterapia. Esta técnica tampoco está exenta de riesgos, fundamentalmente por lesión de órganos adyacentes. Esto ha llevado a diseñar técnicas más precisas, que intentan minimizar estos riesgos, como la radioterapia tridimensional o de intensidad modulada, o la propia braquiterapia. Estas complicaciones son síntomas urinarios como la frecuencia o el dolor, la impotencia y síntomas intestinales como la diarrea (SEOM, 2021).
- Tratamiento hormonal o castración química: cabe señalar aquí que parte de la patogénesis del CP es la activación por parte de las hormonas, como la testosterona y dihidrotestosterona, del receptor nuclear de andrógenos (RAn); lo que supone con posterioridad un aumento en el crecimiento de las células tumorales. (Watson et al., 2015). Ya en el año 1941 Huggins et al. (Huggins et al., 1941) observaron que una deprivación androgénica suponía un tratamiento adecuado tanto para un CP localmente avanzado como para uno metastático. Sin embargo es sabido que existen CP resistentes a la castración, ya desde su inicio o con el paso del tiempo (Watson et al., 2015). Habitualmente este tratamiento es adyuvante a la cirugía o la

radioterapia. Consiste en inhibir al máximo la producción de andrógenos por parte del individuo, lo que disminuye el tamaño tumoral. Este tratamiento es válido en tumores de riesgo intermedio y alto, ya que no está exento de efectos secundarios, habitualmente muy mal tolerados, como disminución del deseo sexual, impotencia, sofocos, crecimiento mamario, etc. (EAU, 2010).

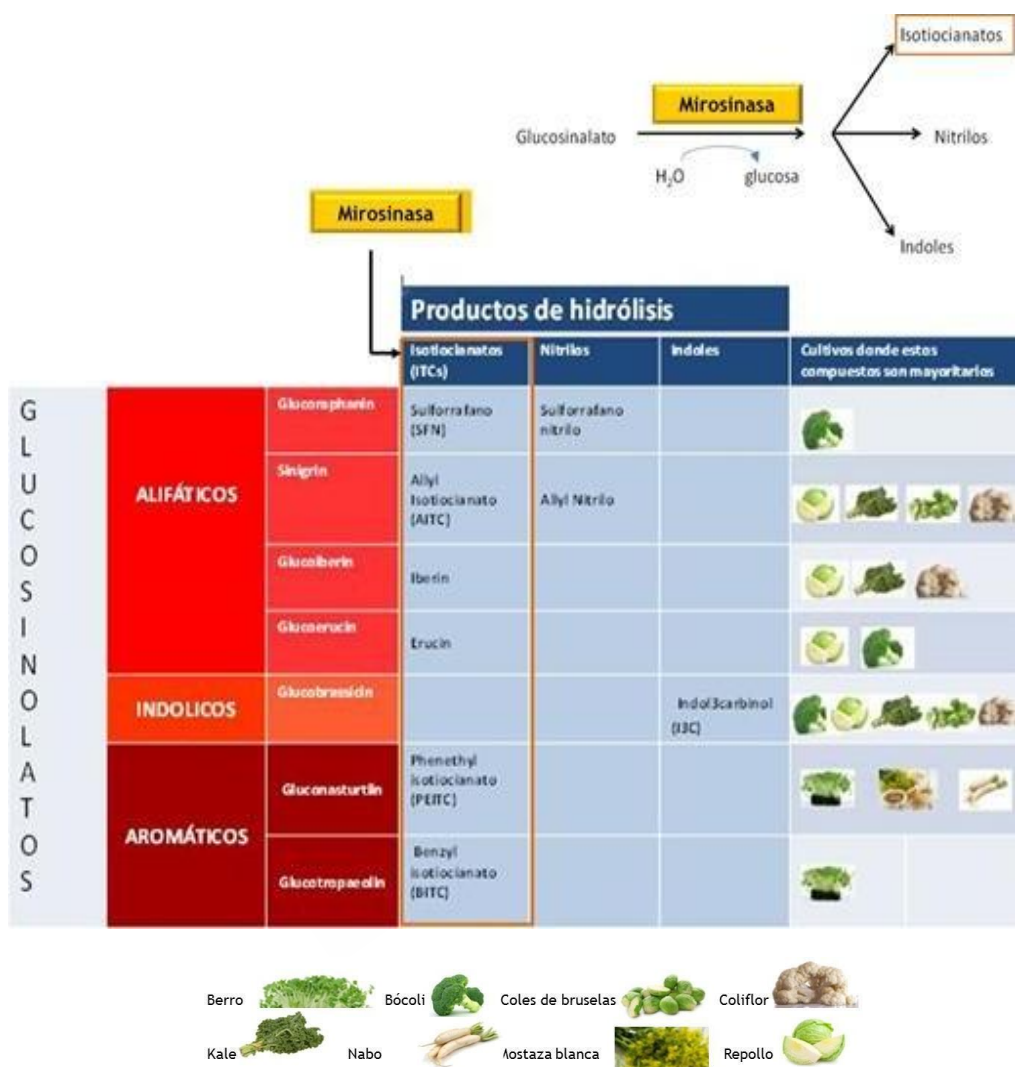
- Otros tratamientos: la crioterapia, basada en daño celular por frío o los ultrasonidos. De momento son tratamientos experimentales (SEOM, 2021).
- Quimioterapia: en el CP esta forma de tratamiento se utiliza por el momento en pacientes con metástasis resistentes a la castración química. El quimioterápico de elección es el DOCE (AECC, 2021). Existen estudios muy recientes que prueban el uso de la quimioterapia en tumores metastásicos previo a la castración química [ensayo clínico *Chemohormonal Therapy Versus Androgen Ablation Randomized Trial for Extensive Disease in Prostate Cancer*), CHAARTED)], obteniéndose resultados prometedores en tumores de gran volumen (Kyriakopoulos et al., 2018).

## 1.2. MOLÉCULAS DE ORIGEN NATURAL: LA FAMILIA *BRASSICACEAE*

La familia *Brassicaceae* comprende 3.709 especies y 338 géneros. Dentro de ellos, el género *Brassica* es el de mayor importancia económica desde el punto de vista de la agricultura porque a él pertenecen varias especies utilizadas como oleaginosas, condimentos, forrajes y vegetales. Dentro del género *Brassica*, tres especies son las más frecuentemente cultivadas y engloban la gran mayoría de los cultivos hortícolas del género: *B. oleracea*, *B. rapa* y *B. napus*. En Europa los cultivos más importantes pertenecen a la especie *B. oleracea*, siendo la coliflor, el brócoli y el repollo los más destacados. Son cultivos muy sensibles a enfermedades y plagas, haciendo que esto afecte a su producción (Novío et al., 2016).

En este contexto, es sabido que las plantas se defienden de las plagas y patógenos sufriendo una serie de cambios adaptativos a nivel molecular, bioquímico y fisiológico. Una de las estrategias de defensa se basa en la síntesis y acúmulo de compuestos de bajo peso molecular llamados metabolitos secundarios. Este hecho, que ocurre en la naturaleza de manera espontánea, está siendo estudiado en detalle para comprender cómo funciona el metabolismo de las plantas o de otro ser vivo y da lugar a la metabolómica (Cartea et al. 2012). Un ejemplo claro de metabolitos secundarios producidos por las plantas y con propiedades defensivas son los glucosinolatos (GSL). Éstos están presentes en las semillas y en los tejidos que realizan la fotosíntesis, exclusivamente en plantas de la familia *Brassicaceae* (Hopkins et al. 2009). Químicamente son  $\beta$ -tioglucósidos N-hidroxisulfatos con una cadena variable R y una molécula de glucosa unida a un elemento S. Dependiendo del aminoácido del que deriven se clasifican en alifáticos (metionina), indólicos (triptófano) y aromáticos (fenilalanina). Una vez que se produce un daño sobre la planta, como una infección o el ataque de un insecto, el GSL es hidrolizado por la enzima mirosinasa, dando lugar a productos de degradación entre los que destacan los isotiocianatos (ITCs) a quienes se les atribuye las propiedades anticarcinogénicas de estas plantas (Figura 1, Tabla 3). Además de los ITCs, otros productos de hidrólisis son los nitrilos e indoles.

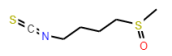

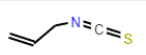
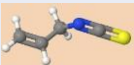
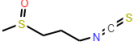


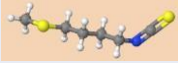

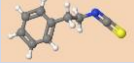
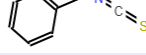

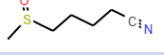
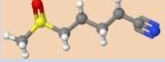
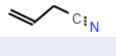
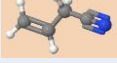






**Figura 1. Tipos de glucosinolatos y productos de hidrólisis.** Elaboración propia.  
Fuente: Novio et al.2016; Cartea et al.2012.

Varios estudios y ensayos clínicos han demostrado el poder anticancerígeno de los vegetales en la dieta (Theodoratou et al. 2009; Deschasaux et al. 2018) y más concretamente de las Brásicas, debido a los GSL y a sus productos de hidrólisis (Royston & Tollefsbol 2015; Novio et al. 2016; Becker et al. 2016) (Tabla 3).

**Tabla 3. Productos de hidrólisis de los glucosinatos. Moléculas.**

	2D	3D
Sulforrafano		
Allyl isotiocianato		
Iberina		
Erucina		
Phenetyl isotiocianato		
Benzyl isotiocianato		
Sulforrafano nitrilo		
Allyl nitrilo		
Indol-3-carbinol		

Elaboración propia programa *biomodel* UAH.

Las verduras y hortalizas son, según el *Informe anual sobre el consumo en España* (Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación, 2017) el grupo de alimentos más consumidos en los hogares españoles, representando 56,8 kg por persona y año. De este grupo, uno de los alimentos que más crecen son las crucíferas, en parte gracias al brócoli. Este alimento aumentó su consumo en un año de

forma muy importante, pasando en 2016 de 5.800 kg en todo el territorio nacional a 62.000 kg (Informe de consumo, 2018) en 2017. Este aumento es debido a campañas de empresas particulares, como la asociación +Brocoli, auspiciadas por el propio Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) debido a las ventajas sobre la salud que tienen estos cultivos.

Es sabido que el beneficio de estas verduras depende del tipo de GSL y de la capacidad de la planta de producir productos de hidrólisis. Varios estudios pretenden aumentar esta producción para facilitar así la concentración de productos de hidrólisis como los ITCs para mejorar su poder quimioterápico (Cartea et al. 2012; Sánchez-Pujante et al. 2017; Natella et al. 2016; Esfandiari et al. 2017).

### **1.3. EFECTOS DE LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE LOS GS EN LOS CÁNCERES HORMODEPENDIENTES**

Este capítulo reproduce contenidos de la publicación *Effects of Brassicaceae on Breast Cancer*. Autores: Pérez-Muñuzuri E, Núñez-Iglesias MJ, Novío S, Cartea ME, García-Santiago C, Soengas P, Macía M, Freire-Garabal M. En revisión para publicación en la fecha de presentación de este trabajo (Apartado de Anexos de esta memoria).

Varios estudios han demostrado una asociación inversa entre el consumo de verduras crucíferas y la prevalencia de diferentes tipos de cáncer. Estudios epidemiológicos indican que la población polaca hay una asociación inversa entre el consumo de verduras crucíferas y la prevalencia de diferentes tipos de cáncer (Fuentes et al., 2015).

Bosetti et al. (2012) han analizado el consumo de vegetales en Italia y Suiza entre los años 1991 y 2009 (11.493 controles y 12.469 casos de 12 tipos de cáncer diferentes). Mediante un cuestionario de frecuencia alimentaria con una pregunta específica sobre el consumo semanal de verduras crucíferas, los investigadores evaluaron el consumo de verduras al menos una vez a la semana en comparación

con el no consumo o el consumo ocasional. Se constató que el riesgo de desarrollar cánceres del tubo digestivo (cavidad oral y faringe, esófago, colorrectum), mama y riñón era significativamente inferior para las personas que consumieron al menos una porción (~125 gramos) de crucífera semanalmente. Así mismo, en el estudio de Li et al. (2018) se comprobó que al triplicar el consumo de repollo se reducía la incidencia de CM, especialmente cuando esta verdura se incorporaba a la dieta a una edad temprana. Por otra parte, existen indicios de que la dieta materna podría influir en la programación epigenética del feto durante la embriogénesis, ocasionando la activación e inhibición de genes supresores y promotores tumorales, respectivamente. Este estudio se realizó con ratones transgénicos alimentados con una dieta rica en brotes de brócoli. Los resultados mostraron la activación epigenética de genes supresores tumorales, la inhibición de genes promotores tumorales como hTERT y c-Myc, la regulación descendente de HDAC1 (histona deacetilasa1) y el aumento de la acetilación de histona, que están implicados en la reactivación de algunos genes supresores como p53 y p16. Por lo tanto, dichos autores también señalaron un efecto de programación quimiopreventiva y fetal transplacentaria de la dieta basada en un mecanismo epigenético.

Existen también ensayos clínicos de fase 2 que utilizan derivados de la hidrólisis de los GSL en pacientes que sufren CM (*Clinical Trial.gov identifier*: NCT00982319). Además, otros ensayos se centran en el cáncer de pulmón tratando de determinar si los derivados de GSL pueden ser una herramienta quimiopreventiva en los fumadores. (*Clinical Trial.gov identifier*: NCT00005883, *Clinical Trial.gov identifier*: NCT00691132). Sin embargo, estudios anteriores han demostrado que no todos los tipos de CM se beneficiarían de estos compuestos. Los derivados de los GSL parecen ser útiles en el CM ductal *in situ*, disminuyendo el biomarcador de proliferación Ki67 (Cade et al., 2011) así como la acetilación de histona, un mecanismo antitumoral bien conocido (Atwell et al., 2015; Higdon et al., 2007). *Clinical Trial.gov identifier*: NCT00843167. También se están llevando a cabo dos ensayos clínicos tratando de determinar si el tipo de receptor hormonal (*Clinical Trial.gov identifier*: NCT01612910),

el grado de diferenciación celular y el tratamiento concomitante hormonal (*Clinical Trial.gov identifier*: NCT02970682) pueden verse influenciados por la suplementación nutricional. (*Clinical Trial.gov identifier*: NCT02970682).

### **1.3.1. Mecanismos moleculares**

A continuación se indican mecanismos moleculares que podrían contribuir al efecto beneficioso de los ITCs en el CM y el CP. Se recogen contenidos del artículo de revisión en fase de sumisión de Perez-Muñuzuri et al. Se anexa a esta memoria de tesis doctoral (Ver apartado de Anexos de esta memoria).

Cabe reseñar que los estudios con ITCs en terapia combinada son muy escasos en la literatura y que los existentes abordan efectos parciales sobre los mecanismos carcinogénicos de CM o de CP y no recogen, con carácter general, el efecto sobre células sanas. Este aspecto es uno de los fundamentos de la presente tesis doctoral tal y como se recoge en el apartado de justificación.

#### **1.3.1.1. Actividad epigenética**

Desde el año 2000, como ya explicamos con anterioridad, el CM se clasificó en cuatro subtipos moleculares: Luminal A, Luminal B, Her 2 y basal-like. Los estudios epigenéticos del cáncer permiten incluso dividirlos en más subtipos. Estos tipos epigenéticos incluyen modificaciones en el ADN, como la acetilación y metilación de histonas, la hipometilación e hipermetilación del ADN, y la regulación post-transcripcional de la expresión génica por micro ARN no codificantes (miRNAs) en los que el cambio está en la función del ADN no en su secuencia. La epigenética se está considerando ahora un elemento clave del desarrollo y la progresión del cáncer; por lo que se están diseñando diferentes estrategias para prevenir las modificaciones epigenéticas que conducirían a dicha patología, incluidos factores asociados a la dieta que pueden, tras cambios epigenéticos, estimular la producción de un CM (Dumitrescu et al.,

2018). Por tanto, dada la importancia de los derivados de la dieta en los cambios epigenéticos hemos realizado una puesta al día de los cambios que producen los compuestos estudiados en esta tesis y que podrían actuar en los mecanismos carcinogénicos del CM y del CP.

En la Tabla 4 se recogen mecanismos epigenéticos atribuidos a ITCs. Diferentes estudios sugieren que los ITCs pueden actuar tanto sobre el inicio como con la progression del cancer a través de cambios epigenéticos (Chiao et al., 2010; Traka et al., 2014; Wong et al., 2014). Con carácter general los cambios epigenéticos incluyen metilaciones de ADN o inhibición de las HDAC (Royston & Tollefsbol, 2015). Con carácter específico describimos algunos de los cambios epigenéticos recogidos en la citada Tabla:

- El SFN tiene un efecto epigenético mediado por hipometilación del ADN, disminución de los niveles de metiltransferasas de ADN (DNMT1, DNMT3B) y disminución de la metilación de ARN N6-metiladenosina (m6A) (Lewinka et al., 2017). A dosis de 10  $\mu$ m produce una regulación ascendente de sesenta micro ARN, regulación descendente de treinta dos microARN, y disminución en los niveles de miR-23b, miR-92b, miR-381 y miR-382 en tres tipos celulares de CM (MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3).
- El SFN aumenta la expresión génica de genes responsables del homólogo de fosfatasa y tensina [fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN)], el receptor de ácido retinoico beta 2 (RAR-2), el RE, la caveocina 1 (CAV1) y la interleucina 6 (IL6). Contrariamente, disminuye la expresión del gen de la transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT). Por otra parte, el tratamiento con SFN disminuye la metilación del promotor PTEN (22% con un aumento dependiente de la dosis en ARNm PTEN 72%), del promotor de la RAR-2 (25% con un aumento del 95% del

ARNm RAR-2) (en células de CM MDA-MB-231, Gianfredi et al., 2017) y de hTERT [en células MCF7 (Meeram et al., 2010) en células de CM MDA-MB-231 (Gianfredi et al., 2017).

- El SFN disminuye la expresión de DNMT y la metilación del ADN (células prostáticas normales como en las células de CP androgeno dependientes (AD) e independientes (AI) (Meeram et al., 2010; Hsu et al., 2011; Meeran et al., 2012; Wong et al., 2014) lo que implicaría la expresión de genes supresores inhibidos en las células de CP. Además, el SFN parece inhibir las actividades de la HDAC (Myzac et al., 2006a; Myzac et al., 2006b; Marks et al., 2001, Gibbs et al., 2009) como la HDAC6, influyendo en el estado de acetilación de la chaperona HSP90 (pieza clave en el RA) que atenúa la señalización RA (Gibbs et al., 2009), y el crecimiento de células CP AD.
- El tratamiento con I3C, así como su producto de condensación, 3'-diindolylmethane (DIM) previno la activación epigenética del gen de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) por los agonistas Ah-R en las células MCF7 (Degner et al. 2009). Su efecto se fundamenta en dos aspectos: (a) que el nivel elevado de COX-2 se asocia a la carcinogénesis; (b) que este gen se activa con el receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) que, a su vez, es activado por algunos compuestos dietéticos y contaminantes como hidrocarburos de arilo policíclicos (Degner et al., 2009).
- Con respecto al PEITC, estudios *in vivo* (con ratones TRAMP) demostraron que puede inhibir la hipermetilación CGI que se produce en la etapa inicial de la carcinogénesis del CP (Wang & Chiao, 2010).

- El papel quimiopreventivo del PEITC en tumores de próstata, leucemia y mieloma (Boyanapalli et al., 2016) es atribuido a actividad epigenética. El PEITC interfiere en varios puntos del ciclo celular que promoviendo el secuestro celular e inhibiendo su viabilidad. Las proteínas de choque térmico (HSPs) ayudan a las células a sobrevivir en condiciones adversas, promoviendo la supervivencia celular, pero, en células de CM también juegan un papel importante en la diferenciación, invasión, proliferación y metástasis y se convierten en un factor de mal pronóstico (Sarkars et al., 2013). PEITC disminuye la síntesis de las HSPs, lo que significa una detención en la fase G2/M de las células MCF7 y MDA-MB-231 células. También regula a la baja la expresión de proteínas involucradas en la transición G2/M, como Cyclin B1, CDK1, CDC25C y *polo-like kinase 1* (PLK-1) en ambos tipos de células (Sarkar et al., 2013).
- Por otra parte, PEITC regula positivamente la expresión del p53 salvaje en células MCF7, pero disminuye la p53 mutante en células MDA-MB-231 e induce una regulación ascendente de p21 independientemente del estado de p53. PEITC también inhibe NF-KB y sus subunidades p50 y p65 (Sarka et al., 2013).



**Tabla 4. Mecanismos epigenéticos *in vivo* e *in vitro***

<b>IN VITRO</b>			
<b>MOLECULAS</b>	<b>EFECTO</b>	<b>TIPO CELULAR</b>	<b>Ref.</b>
SFN	↓ DNMT1, DNMT3B, RNA methylation, miR-23b, miR-92b, miR-381 and miR-382	MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3	Lewinska et al. 2017
SFN	↑ PTEN, RARB2, CAV1, ERα, IL6 ↓ hTERT	MDA-MB-231	Gianfredi et al., 2017
SFN	↓ hTERT	MDA-MB-231 y MCF7	Meeran et al. 2010
I3C	↓ COX-2	MCF7	Degner et al., 2009
PEITC	↑ alpha-tubulina	MDA-MB-231 y MCF7	Cang et al. 2014
<b>IN VIVO</b>			
<b>DIETA</b>	<b>EFECTO</b>	<b>ESPECIE ANIMAL</b>	<b>Ref.</b>
Tratamiento dietético con brotes de brócoli prenatal/materno	↑ P53, p16, hTERT, c-Myc ↓ HDAC1	2 modelos transgénicos de ratones C3(1)-SV40 Tag (FVB-Tg(C3-1-125 TAg)cJeg/JegJ) (SV40) y FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mu (Her2/neu)	Li et al. 2018

Elaboración propia. Abreviaturas: ↑ aumento de expresión o cantidad de proteína; ↓ disminución de expresión o cantidad de proteína; 3B; cox-2: ciclooxigenasa-2; CAV1: caveolin 1; DNMT1: DNA metiltransferasa 1; DNMT3B: DNA metiltransferasa; hTERT: transcriptasa inversa de la telomerasa humana; I3C: Indol-3carbinol; , IL-6: interleuquina 6; miR-23b, miR-92b; miR-381 and miR-382: microRNAs; PEITC: phenethyl isotiocianato; PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa; RARB2: receptor β2 del ácido retinoico; REα: subunidad del receptor estrogénico; SFN: sulforrafano.

### 1.3.1.2. Actividad antiproliferativa

Diferentes estudios postulan el efecto antiproliferativo sobre células de CM y CP de diversos ITCs, si bien en su inmensa mayoría no verifican el efecto de las dosis ensayadas sobre las células sanas de mama y de próstata. Como se indica en la justificación de esta memoria es uno de los aspectos en los que se fundamentan los ensayos recogidos en esta tesis doctoral.

A continuación se recogen algunos de los estudios al respecto realizados en modelos *in vitro* e *in vivo* de CM y CP:

- El SFN (Jackson & Singletary, 2004a; Azarenko et al., 2008) y el AITC (Sayeed et al., 2018) inhiben la proliferación en células MCF7. En el caso del SFN el efecto se le atribuye a la interrupción de los microtúbulos mitóticos, la detención del ciclo celular entre la fase G2 (Jackson & Singletary, 2004a; Azarenko et al., 2008). En células F3II *in vitro* e *in vivo* (en ratones BALB/c) el SFN presenta un efecto similar atribuido al mismo mecanismo (Jackson & Singletary, 2004b).
- La erucina inhibe la proliferación y la detención del ciclo celular de las células de CM MCF7 (Azarenko et al., 2014), MDA-MB-231, SKBR 3 y T47D (Prelowska et al. 2017) al suprimir la dinámica de los microtúbulos (Azarenko et al., 2014; Prelowska et al., 2017) y disminuir la fosforilación de la proteína ribosómica S6 (Prelowska et al., 2017) y la viabilidad celular de una manera dependiente de la concentración (Prelowska et al., 2017). Otro mecanismo que puede contribuir a la actividad antiproliferativa es la reducción de los niveles de receptores Her2 en células SKBR-3 (Prelowska et al., 2017).

- Al I3C se le atribuyen efectos antiproliferativos que podrían estar mediados por diferentes mecanismos (Tabla 5). Entre ellos se incluyen:
  - ✓ La disminución de la expresión del receptor 1 del factor de crecimiento tipo insulina (IGF1R) y del receptor de insulina sustrato-1 (IRS1) y la detención del ciclo celular en la fase G1 (Marconett et al., 2011). Este último mecanismo podría estar mediado por la inhibición de la expresión de hTERT, a la inhibición de la unión de RE $\alpha$  y Sp1 endógenas a un elemento compuesto dentro del promotor hTERT, a la alteración de la expresión de hTERT y a la fosforilación del factor de transcripción Sp1 (Sp1) (Marconett et al. 2011). Dado que dichos aspectos se han observado en células MCF7, podrían explicar sus efectos sobre la proliferación de las células hormonosensibles en el CM. Es sabido que el estradiol (E2) tiene una actividad proliferativa mediada por la subunidad del receptor de estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ ). Además, E2 regula la expresión mediada por ER $\alpha$  de IGF1R e IRS1. Es posible que reduzca la expresión de RE $\alpha$  (Marconett et al., 2012).
  - ✓ Además se cree que existen otros mecanismos que son comunes a diferentes líneas celulares (MDA-MB-468, MDA-MB-231, MCF7 y HBL100) como la fosforilación de tirosina. Lo cual produciría la disminución de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y cambios de las proteínas del ciclo celular (p21-cip1, Cyclina D1, ciclina, p27Kip1, CDK6). Ello, en última instancia conduciría a la detención del ciclo celular aunque sólo en células MCF7 y MDA-MB-231. Algunas

de dichas funciones se cree que están mediadas tanto por la fosforilación de la tiroquinasa Src (Src) (Moiseeva et al., 2007; Firestone et al., 2003; Cover et al. 1998; Cram et al., 2001) como por la inhibición de CDK2 (células MCF7). Bajo tratamiento con I3C se induce la formación de un complejo de proteína CDK2 de 200 kDa significativamente más grande que contiene una ciclina E de 50 kDa y una proteína inmunorreactiva de ciclina E de 75 kDa, que es enzimáticamente inactivo, localizado en el citoplasma en lugar del núcleo donde debería estar la ubicación en las células en proliferación (García et al., 2005).

- ✓ El oncogén cDc25A se sobreexpresa en múltiples cánceres. Se supone que es un indicador de mal pronóstico y que está involucrado en la progresión del ciclo celular. En células MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468, y en ratones hembra BALB/c atímicos (nu/nu), I3C induce una disminución de cDc25A (Wu et al., 2010). Otra forma para producir una detención del ciclo celular es el aumento del interferón gamma (IFN $\gamma$ ). Esta molécula tiene efectos antiproliferativos y apoptóticos bien conocidos en las células de CM. La asociación de ambos, I3C e IFN $\gamma$ , produce un efecto sinérgico sobre el ciclo celular aumentando la detención del ciclo celular en la fase G1 por la regulación positiva de p21. Este es un gen que regula el ciclo celular. La proteína que codifica inhibe una quinasa dependiente de ciclina. Además está regulado por el p53 (Chatterji et al., 2004).
- ✓ I3C puede inducir una interrupción de la transcripción del factor nuclear kappa (NF-KB)

potenciador de la cadena ligera de las células B activadas que controlan la transcripción y supervivencia del ADN de las células. Este mecanismo está mediado por la transcripción de inhibición de elastasa. Los altos niveles de elastasa se correlacionan con un mal pronóstico y una menor tasa de supervivencia (Aronchik et al., 201; Nguyen et al., 2008). Este efecto también se observa con DIM, un producto de condensación de I3C (Rahman & Sarkar, 2005).

- ✓ El sistema de citocromo (CYP) P450 tipo 1 está involucrado en una 4-hidroxilación implicada en la síntesis de estrógenos catecol potencialmente cancerígenos. La expresión de las familias de genes CYP1A y CYP1B está mediada por un receptor de hidrocarburos de arilo (AhR). El I3C aumenta la expresión de CYP1A, CYP1B y AhR en células MCF7. Ociepa-Zaw et al., (2007) consideran que el aumento de la tasa CYP1A/CYP1B es el mecanismo de acción de estrógenos y antiestrógenos más importante del I3C. Antes de este estudio, sólo la acción en CYP1A se conocía para el I3C (Tiwari et al., 1994; Ashok et al., 2001).
- ✓ El I3C activa p21 a través del aumento de p53 en la línea celular MCF10A. En casi un 20% de los CM, p53 está en forma mutante. En varias líneas celulares tumorigénicas (T7D, SK- Br3) e invasivas (MDA-M -231, MDA-MB-435) con proteína p53 mutante, las células se estabilizan en fase G1 con tratamiento con el I3C. Sin embargo, en el tipo MCF7, este compuesto no parece aumentar el nivel de p53 (Brew et al., 2006).

- Otros compuestos derivados del I3C como el 1-bencil-indol-3-carbinol o CTet y el Ctr poseen efectos antitumorales. El CtTet, un derivado tetramérico, tiene un efecto antiproliferativo y antiestrogénico no solo en las células RE+ (MCF7), sino también en las RE- (MDA-MB-231) (Nguyen et al., 2010); mostrando efectos *in vivo* (De Santi et al. 2011). El CTr (5,6,11,12,17, 18-hexahidrociclonona [1,2-b:4,5-b':7,8-b'] triindol) es un compuesto agonista de estrógenos que muestra un comportamiento competitivo con estradiol en el RE (Riby et al., 2014).



Tabla 5. Efectos de I3C en el ciclo celular.

Diana	MDA-MB-468	MDA-MB-231	MCF7	HL-100	MCF10A	Ref
IGFR-1			↓			Marconett et al. 2012
IRS1			↓			Marconett et al. 2012
ERα			↓			Marconett et al., 2012 Tiwari et al. 1994
hTERT			↓			Marconett et al. 2011
EGFR	↓ (86+/-9%)	↓ (31+/-8%)	↓ (44+/-22%)	↓ (30+/-12%)		Moiseeva et al., 2007 Firestone et al. 2003
P21-cip1		↑	↑			Moiseeva et al. 2007 Cover et al. 1998 Wu et al. 2010
CyclinD1		↓	↓			Moiseeva et al. 2007
CyclinE			↑(no significativo)			Moiseeva et al. 2007 Cram et al. 2001
P27-Kip1		↑				Moiseeva et al. 2007 Cover et al. 1998

Cont. Tabla 5						
CDK6		↓	↓			Moiseeva et al. 2007 Firetone et al. 2003 Cover et al. 1998 Cram et al. 2001
CDK2			↓			Garcia et al. 2005
cDc25A	→	↓	↓			Wu et al. 2010
IFN <sub>γ</sub>			↑			Chatterji et al. 2004
NF-KB		↓				Aronchik et al. 2010
Elastase		↓				Aronchik et al. 2010 Nguyen et al. 2008
CYP1A		≈	↑			Ociepa-Zawal et al. 2007 Tiwari et al. 1994 Ashok et al. 2001
CYP1B			↑			Ociepa-Zawal et al. 2007
CYP1A/CYP1B			↑↑			Ociepa-Zawal et al. 2007
AhR			↑			Ociepa-Zawal et al. 2007
P53	↑	↑	≈		↑	Brew et al. 2006

Elaboración propia. Abreviaturas: ↑: aumento de expresión mejorada o nivel de proteína, ↓: disminución de expresión o nivel de proteína, ≈: ningún cambio en la expresión o nivel de proteína, AhR: receptor de hidrocarburo arilo, CDK6: proteína de división celular quinasa 6, CDK2: proteína de división celular quinasa 2, cDc25A: célula división ciclo 25 homólogo A, CYP1A: citocromo p401A, CYP1B: citocromo p450 1B, ERα: receptor de estrógeno α, hTERT: transcriptasa inversa de telomerasa humana, I3C: indol-3carbinol, IGFR-1: receptor de factor de crecimiento similar a la insulina-1, IFN γ: interferón gamma, IRS1: sustrato receptor de insulina-1, NF-KB: factor nuclear kappa-potenciador de la cadena ligera de células B activadas, P53: proteína p53, p21-cip1: inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1, p27-Kip : Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1B.



Con respecto al CP se pueden observar los efectos del SFN, el PEITC y el BITC con distintas líneas celulares en modelos animales. En general podemos decir que según la literatura los ITCs disminuyen la proliferación celular en células de CP en estudios *in vivo* (Tabla 6).

**Tabla 6. Efectos de los ITCs *in vivo* sobre el ciclo celular en modelos de CP.**

ITC	Mecanismo	Modelo	Ref.
SFN	↓ cox2	Ortotópico (PC3)	Shankar et al. 2008
SFN	↓ Cyclina D1	Ortotópico (PC3)	Shankar et al. 2008
SFN	↓ IL6	Ortotópico (PC3)	Shankar et al. 2008
SFN	↓ IL8	Ortotópico (PC3)	Shankar et al. 2008
SFN	↓ Ki-67	Ortotópico (PC3)	Shankar et al. 2008
SFN	↓ Ki-67	CAM Xenoinjerto (PC3)	Labsch et al. 2014
SFN	↓ PCNA	TRAMP	Singh et al. 2009
SFN	↓ PCNA	Ortotópico (PC3)	Shankar et al. 2008
PEITC	↓ Akt	TRAMP	Barve et al. 2008
PEITC	↓ FKHR	TRAMP	Barve et al. 2008
PEITC	↑ IGFBP3	Xenoinjerto subcutáneo (LNCaP)	Li et al. 2013
PEITC	≈ Ki 67	Xenoinjerto subcutáneo (LNCaP)	Hudson et al. 2012
PEITC	↓ Ki 67	TRAMP	Powolny et al. 2011
PEITC	≈ PCNA	Xenoinjerto subcutáneo (LNCaP)	Hudson et al. 2012
PEITC	↓ PCNA	TRAMP	Barve et al. 2008
PEITC	↓ PCNA	Xenoinjerto subcutáneo (PC3)	Xiao & Singh 2010
PEITC	↓ PDK1	TRAMP	Barve et al. 2008
BITC	↓ Ki67	TRAMP	Cho et al. 2016
BITC	↓ Cyclina D1	TRAMP	Cho et al. 2016
BITC	↓ Cyclina A	TRAMP	Cho et al. 2016
BITC	↓ Cdk2	TRAMP	Cho et al. 2016

Elaboración propia. Abreviaturas: ↑, aumento de expresión; ≈, sin cambios en la expresión; ↓, disminución de la expresión; BITC, Benzylisothiocianato; cox-2, cyclooxygenasa 2; CAM: membrana corioalantoidea; FKHR, factor de transcripción forkhead; IGFBP3, insulin-like growth factor binding protein; IL, interleuquina; PCNA, antígeno nuclear de proliferación celular; PDK1, Kinasa piruvato dehidrogenasa, isozima 1; PEITC: Phenetyl isotiocianato; SFN, Sulforafano; TRAMP: adenocarcinoma de próstata transgénico en modelo animal en ratones.

### 1.3.1.3. Actividad apoptótica

La apoptosis es la muerte celular programada o muerte celular tipo I. Tiene dos mecanismos principales: vía extrínseca e intrínseca. En el primer caso, la señal apoptótica es activada por un receptor transmembrana (receptor de muerte) como el TNF (factor de necrosis tumoral) que desencadena una cascada de eventos que termina a través de la activación de las caspasas 3 y 7, con la muerte celular. En el segundo caso, el estímulo es de tipo intracelular, como daños en el ADN o hipoxia. En esta última vía existe una gran familia de proteínas proapoptóticas (Bax, Bak y Bim) y otra con propiedades anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL o MCL-1). El pulso entre estas proteínas produce un equilibrio en la membrana mitocondrial. Cuando es necesario y se activa el proceso de muerte celular programada se permite la salida del citocromo-c del interior de las mitocondrias para unirse a la proteína APAF1 y crear un apoptosoma que finalmente activará las caspasas 9 y 3 (Elmore, 2007).

A continuación se analizan los mecanismos apoptóticos en el CM que se atribuyen a diferentes ITCs (Figuras 2 y 3):

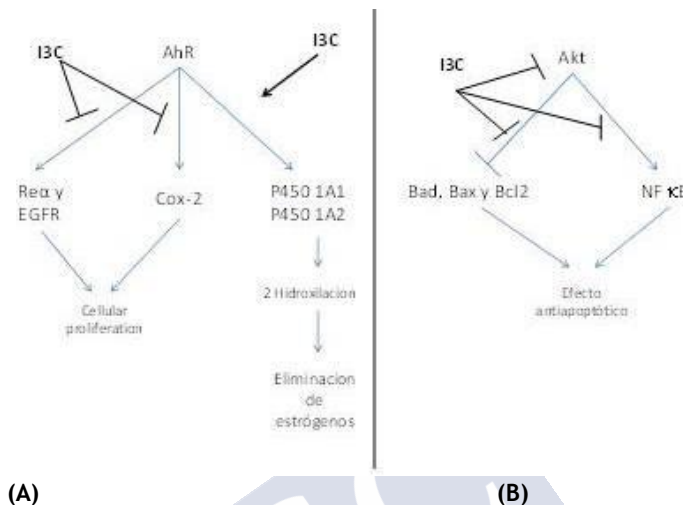
- El SFN podría inducir la apoptosis en cuatro líneas celulares (MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF7 y T47D). En MDA-MB-231 activaría la vía extrínseca aumentando la expresión del gen FAS que codifica un receptor transmembrana de la súperfamilia del TNF, y aumentaría también la actividad de la caspasa 3 y 8, pero no la de la caspasa 9. En estas células, Bcl2 y la localización del citocromo c no se alteran. Sin embargo, en los otros tres tipos celulares, la vía intrínseca se activaría mediante la escisión de la poli ADP ribosa polimerasa (PARP), proteína intracelular ligada a procesos de reparación de ADN, estimulando la caspasa 3 y 9, pero no la 8, y permitiendo la salida del citocromo c de las mitocondrias (Pledge-Tracy et al., 2007).
- Sin embargo, otros estudios indican la activación de ambas vías a través de cambios en las HSPs. Las HSPs son moléculas

que están involucradas en ambos tipos de apoptosis y también se ven afectadas por SFN. Estas proteínas se encuentran incrementadas en células de CM (MCF7 y MDA-MB-231) y el SFN reduciría su expresión, especialmente las HSP 27, 70 y 90 en estas células. En esta situación se ha observado la regulación positiva de algunas proteínas como la Apaf-1, Bax, Bad, citocromo-c y caspasa 3, 8 y 9. Sin embargo, el grado de elevación de la caspasa 8 no es tan significativo como el de las otras caspasas, lo que lleva a considerar, junto con la regulación a la baja de Bcl2, que la vía intrínseca debería ser la vía más importante de actuación del SFN. (Sarkar et al., 2012; Kanematsu et al., 2010).

- También es importante tener en cuenta los beneficios derivados del tratamiento concomitante con otros agentes quimioterápicos como la doxorrubicina. Estos agentes reducen su eficacia cuando p53 está en forma mutante p53 (Ser220). Sin embargo, cuando se combina con SFN, este compuesto restaura la sensibilidad de los agentes quimioterápicos e induce la apoptosis por la vía intrínseca (Fimognari et al., 2006).
- Se ha observado que el AITC produce apoptosis en células MCF7 y, en menor grado, en células MDA-MB-231. Este compuesto induciría la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) en ambos tipos de células y los potenciales de membrana mitocondrial, lo que provocaría la liberación de citocromo C, con un aumento de la proteína Bax y una disminución de Bcl2. También han apreciado el aumento de actividad de la caspasa 9 en las células MCF7 pero no de forma significativa de la caspasa 3. Sin embargo en las células MDA-MB-231, ocurriría lo contrario; con un incremento de actividad de la caspasa 3 y una alteración no significativa de la caspasa 9. También se ha observado la actividad de PARP, no sólo en estas células sino también en las MDA-MB-468 (Bo et al. 2016) (Tsai et al., 2012).

- Con respecto a la erucina, parece que su acción podría estar mediada por sus efectos antiestrógenos (Pawlik et al. 2016). Los antiestrógenos se usan generalmente para los cánceres RE+ pero, en algunos casos, por diferentes mecanismos, pueden surgir resistencias a esta terapia hormonal y además, estos medicamentos no están exentos de efectos secundarios. La erucina induciría la muerte celular y también potenciaría el efecto del tamoxifeno en las líneas celulares MCF7, T47D y BT-474. La erucina no sólo potenciaría el efecto del tamoxifeno sino que sensibilizaría a las células resistentes a este fármaco (Pawlik et al., 2016). Además, la erucina también exhibiría una acción anti HER2. Existe una sobreexpresión de este receptor en casi una cuarta parte de todos los CM siendo esto causa de la evasión de la apoptosis por parte de estas células. Los medicamentos más utilizados para este tipo de tumor son trastuzumab y lapatinib. Cuando se combinan con erucina en laboratorio, el efecto pro-apoptótico de estos fármacos es mejorado y, promueve la apoptosis en SKBR3 células (Kaczyńska & Herman-Antosiewicz 2017; Kaczyńska et al., 2016; Prełowska et al., 2017).
- Además, se cree que la erucina induce apoptosis mejorando la translocación mitocondrial de cofilina y Drp1. En MCF7 y MDA-MB-231 células este compuesto aumenta el nivel de cofilina y Drp1 en el interior de las mitocondrias y lo disminuye en el citosol (Li et al., 2015).
- Los mecanismos implicados en la actividad apoptótica de I3C se recogen en la Figura 2. Parecen existir dos vías de actuación en la inducción de la apoptosis de las células con CM. Es sabido que tanto la activación de la vía de NF-KB como de la de Akt juegan un papel importante en la inhibición de la apoptosis en las células tumorales y por tanto en su perpetuación y continuo crecimiento. Es probable que estas

dos vías estén a su vez relacionadas, ya que el Akt parece estimular al NF-KB. Esta forma de supervivencia celular también está asociada con la activación e inhibición de moléculas apoptóticas y antiapoptóticas de la cascada de la vía intrínseca (Popolo et al., 2017; Rahman et al., 2000; Sarkar & Rahman, 2003; Hong et al., 2002). El I3C inhibiría tanto la activación de NF-KB como de Akt, en células tumorogénicas y premalignas, no así en las células normales, produciendo así el efecto apoptótico deseado (Rahman & Sarkar 2004; Rahman & Sarkar 2005; Rahman et al., 2003). El AhR interviene en la degradación de hidrocarburos, potencialmente cancerígenos, a través de la estimulación de la actividad de diversas enzimas citocrómicas. Este proceso también se produce para la eliminación de los estrógenos circundantes, proceso que es favorecido por el I3C en las células de CM. (Caruso et al., 2014; Moiseeva et al., 2007, Popolo et al., 2017). Además, el I3C también disminuiría la expresión de proteínas proinflamatorias como la cox-2; así fármacos como la doxorrubicina, considerado un fármaco muy cardiotóxico por el aumento de ROS y cox-2 en el interior de las células cardíacas, se vería beneficiado de su unión al I3C al disminuir la producción de estos elementos y por tanto de su cardiotoxicidad (Hajra et al., 2018).

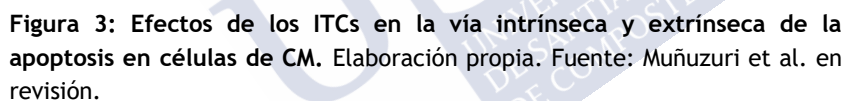


**Figura 2. Mecanismos de acción más importantes de I3C.** (A) Acción antiproliferativa. (B) Acción apoptótica. Elaboración propia. Fuente: Muñuzuri et al., en revisión.

- El tratamiento con PEITC en células BRI-JM04, MCF7 y MDA-MB-231 mejora los mecanismos apoptóticos de moléculas proapoptóticas como Bak, Bax, Bim (mediador de muerte celular en células beta de linfoma tipo 2) y PUMA (modulador de la apoptosis inducido por p53) e inhibe la moléculas anti apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-x L (Hahm y Singh, 2012; Lee y Cho, 2008). Este efecto también se observa en células MCF7 y MDA-MB-231 transfectadas de manera estable con HER2 en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Gupta & Srivastava, 2012; Sing et al., 2012). Otro mecanismo es la potente inhibición de HSP 27, 70 y 90, lo que supone la activación de caspasa 9 y 3 en células MCF7 y MDA-MB-231 (Sarkars et al., 2013). Parece que las células MDA-MB-231 son más sensibles a la apoptosis por PEITC que MCF7. La razón debería ser que tienen menos nivel basal de ROS y menos capacidad de adaptación a los antioxidantes que las

células MCF7 (Syed Alwi et al., 2012). Además, el tratamiento con PEITC mejora la expresión de siete genes supresores (p53, ATF-2, hsp27, BRCA2, IL2, p57 y CYP19) (Moon et al., 2011).

- Con respecto al BITC se ha observado que puede modificar la expresión de Bad y Bax en células de CM con sfRON. El receptor RON puede expresarse en forma completa (5 kb) y truncada (2 kb, sfRON) en el CM. Este receptor es poco conocido pero, en las células de CM, la sobreexpresión de RON está asociada a un aumento de la metástasis (Sehrawat y Singh, 2015; Rao 2013; Xiao et al., 2006). Las células con sfRON (MCF7 y MDA-MB-361) tratadas con tienen una regulación positiva más activa de Bad y Bax que aquellas sin este tipo de receptor (Sehrawat & Singh 2015; Rao 2013). Se ha observado una regulación excesiva de proteínas proapoptóticas y una baja regulación de proteínas antiapoptóticas inducidas por este compuesto en células MCF7 y MDA-MB-231 (Xiao et al., 2006).
- El BITC también produce la apoptosis mediada por ROS en células MDA -MB-231 y MCF7 células gracias a la inhibición del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial y, por último, la activación de la vía intrínseca (Xiao et al., 2008). Además, produce apoptosis en estudios *in vivo* con ratones transgénicos MMTV-neu (Kim et al., 2013).
- Por otra parte, el BITC inhibe otras proteínas antiapoptóticas estimuladas por p53 como cIAP1, XIAP y survivina, en células MCF7 y MDA-MB-231 en condiciones *in vitro* e *in vivo* (Kim & Singh, 2010),





Con respecto al CP en estudios *in vivo* se observa un cambio en la proporción de miembros de la familia Bcl-2 proapoptóticos vs antiapoptóticos tras la administración de ITCs. Los niveles de proteínas proapoptóticas Bad, Bak, Bax y Bid están significativamente sobreexpresados en tumores de ratones tratados con PEITC o SFN (Singh et al., 2004; Xiao et al., 2006; Singh et al., 2009; Myzak et al., 2007). Además, la administración de ITCs ocasiona una marcada disminución en el nivel de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Mcl-1 (Singhet et al., 2009; Xiao & Singh et al., 2010).

Bcl-2, proteína antiapoptótica, no se expresa en las células epiteliales normales, pero su sobreexpresión en células LNCaP las protege de la apoptosis y confiere resistencia al tratamiento de ablación androgénica (Raffo et al., 1995). Además, este aumento de la expresión de Bcl-2 es necesaria para la progresión de las células LNCaP desde el estado dependiente de andrógenos al estado independiente de andrógenos (Lin et al., 2007) y predice la recurrencia y la escasa supervivencia del cáncer localizado después de la prostatectomía radical (Bauer et al., 1996; Matsushima et al., 1997). Otra característica importante es que la evasión de la apoptosis por parte de las células de CP se produce tanto por una alteración de la función como de los niveles de reguladores de la apoptosis. Entre ellos, el XIAP y la survivina, proteínas antiapoptóticas, se sobreexpresan en el CP humano (Berezovskaya et al., 2005; Seligson et al., 2007). Este hecho está asociado con la recurrencia del CP (Seligson et al., 2007). Asimismo, existe una correlación entre la expresión de survivina y la invasión neural en las muestras de anatomía patológica (Rodríguez-Berriguete et al., 2015).

#### 1.3.1.4. Actividad autofágica

La muerte celular tipo II o autofagia es un mecanismo que ocurre en las células normales y tumorales al vulnerarse su viabilidad, iniciándose la degradación de sus orgánulos y proteínas. En el CM se demostró recientemente que este mecanismo permite que las células sobrevivan como células latentes (Vera-Ramirez et al., 2018). Sin embargo, existe controversia sobre si la autofagia causa la muerte o protege la célula (Kondo & Kondo,

2006). Varios tratamientos oncológicos, como el tamoxifeno, la amsacrina, la temozolomida y el etopósido, son inductores de muerte celular autofágica.

El SFN induce la autofagia en las células MDA-MB-231, produciendo numerosos autofagosomas y autolisomas en el citoplasma (Kanematsu et al., 2010). También se ha encontrado un efecto sinérgico con 5-fluoracilo en este punto (Milczarek et al., 2018; Chirumbolo & Bjørklund, 2018).

El BITC produce varios efectos relacionados con la autofagia, incluyendo la aparición de vacuolas de doble membrana y orgánulos vesiculares ácidos, así como la escisión de la proteína 1 de la cadena ligera asociada a los microtúbulos 3 (LC3) en MDA-MB-231, MCF7, MDA-MB-468, BT-474 y BRI-JM04 y en los xenoinjertos de MDA-MB-231 (Xiao et al., 2012).

#### 1.3.1.5. Actividad antimetastática

Las células de CM tienen características epiteliales con forma la forma de epitelio columnar con adhesión célula a célula gracias a la polarización apico-basolateral y debido a proteínas como E-cadherina u ocludina. Cuando las células activan su migración, inician una transición epitelial a mesenquimal (EMT) alterando su superficie a una forma espiculada, perdiendo su adhesión y polarización, y cambiando sus proteínas principales a vimentina, N-cadherina, metaloproteinasas (MMP) y fibronectina. Cuando llegan a un nuevo lugar en el organismo, conocido como sitio secundario, las células tienen que cambiar nuevamente a epiteliales desde su estado mesenquimal (Scheel & Weinberg, 2012).

Esta capacidad del CM, así como de otras células tumorales sólidas para migrar, se convierte en un riesgo potencialmente grave, porque la mayor parte de las muertes por CM se producen en pacientes con metástasis.

La capacidad de las células de CP de salir del órgano original para metastatizar está modulada por andrógenos de una manera dependiente de dosis. (Hsiao et al., 2015). Existen unos factores de transcripción codificados por la familia de genes ETS, entre ellos ERG y ETV1 (Tomlins et al., 2005), que cuando se sobreexpresan, supone una regulación positiva del gen de su receptor CXCR4, observándose en ese momento un aumento de la motilidad celular, lo que supone posibilidad de migración y metástasis. (Gopalan et al., 2009).

En este apartado se indican los efectos antimetastáticos de ITCs (Tabla 7).

- Las MMP son proteínas secretadas por las células de CM para digerir la matriz extracelular, por lo que son muy importantes en la EMT. El SFN disminuye la actividad de MMP14 y MMP7, pero otras MMP se mantienen estables. Por otra parte, el SFN disminuye la vimentina a medida que se aumenta la dosis y el tiempo de interacción en células MDA-MB-231. (Hunakova et al., 2009). SFN también inhibe la vía de Hedgehog que se ha sugerido que juega un papel importante en la migración y metástasis de las células de cáncer de mama. Al final de esta vía se produce una activación de MMP 2 y 9, que son claramente inhibidas por SFN (Bao et al., 2016). Así mismo, a dosis de 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M inhibe la migración celular (Hahm et al. 2012). Parece que SFN reduce los niveles de proteínas necesarios para la EMT en las células DU145 y PC3 (Labsch et al., 2014) e incrementa la E-cadherina que favorece la existencia de la forma epitelial de la célula al tiempo que regulación negativa de CD44v6, que reducen la expresión y actividad de MMP-2, la cual favorece la forma mesenquimal de las células DU145 (Peng et al., 2015).

- El SFN inhibe la leptina, proteína relacionada con la obesidad y el CM y un mediador clave que aumenta la migración e invasión de las células MCF7 y MDA-MB-231 (Kim et al., 2011).
- El I3C inhibe la EMT al aumentar la expresión de E-cadherina y los genes supresores de tumores como PTEN y BRCA1 en células T47-D, MCF7 y MDA-MB 468 (Meng et al., 2000a Meng et al. 2000b). También inhibe MUC1, una proteína asociada con mal pronóstico en células MCF7 y MDA-MB-468 (Lee et al., 2004). De ahí que se considere que el mecanismo por el cual el I3C inhibe la EMT es independiente del receptor de estrógenos.
- El PEITC, *in vitro*, aumenta la vimentina en MDA-MB-231 células. Sin embargo, los estudios *in vivo* con ratones con virus de tumor mamario (MMTV-neu) muestran que PEITC disminuye el nivel de vimentina, lo que supondría una inhibición de EMT (Sakao et al., 2013).
- El BITC produce inhibición de EMT en estudios *in vitro* e *in vivo* ya que aumenta la expresión de E-cadherina en células MDA-MB-231 (epiteliales) y SUM159 (mesenquimales), que tienen una cantidad muy baja de esta proteína, al tiempo que disminuye la vimentina en ambos tipos. (Sehrawat & Singh, 2011, Sehrawat et al., 2013). En células MCF7 ocasiona aumento de E-cadherina aunque en menor cuantía, lo que se atribuye a la menor concentración de esta proteína en dichas células. En estudios *in vivo* usando ratones atímicos hembra, BITC aumenta la cadherina E y disminuye la vimentina.

- El tratamiento con BITC también induce la supresión de los niveles del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) y del receptor de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR) en las células MDA-MB-231, SUM159 y MDA-MB-468. Se sabe que la sobreexpresión de uPA y uPAR, es un mecanismo de proteólisis de matriz extracelular, que supone el punto de partida de EMT. Un efecto similar ocurre con FOXQ1 (gen relacionado tanto con el ciclo celular como con la EMT), que también disminuye con BITC en estas células (Sehrawat et al., 2013). Esta molécula se probó en ratones hembra BALB / C-un/nu implantados con células MDA-MB-231 y MCF7 para confirmar la inhibición de la resorción ósea osteolítica en el CM. En algunos ratones, se produce una regresión completa de la metástasis ósea (Sehrawat et al., 2013). Además, en ratones BALB/c hembra, redujo la formación de nódulos tumorales pulmonares, así como la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y MMP2 y 9 (Pore et al., 2018). Igual que el SFN, BITC también inhibe la acción de la leptina (Kim et al., 2011).
- En estudios *in vivo* en ratones TRAMP se ha constatado que una dieta con PEITC provoca una sobreexpresión de E-cadherina de forma estadísticamente significativa (Powolny et al., 2011), con una pérdida de expresión de marcadores mesenquimales, como la vimentina (Sakao et al., 2013).

Tabla 7. Efectos de los ITCs en la EMT en CM.

ITC	Factor	Acción	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Referencia
SFN	vimentina	↓	MDA-MB-231		Hunakova et al. 2009
SFN	MMP7	↓	MDA-MB-231		Hunakova et al. 2009
SFN	MMP14	↓	MDA-MB-231		Hunakova et al. 2009
SFN	MMP2	↓	MDA-MB-231		Bao et al. 2016
SFN	MMP9	↓	MDA-MB-231		Bao et al. 2016
SFN	leptina	↓	MDA-MB-231 y MCF7		Kim et al., 2011
I3C	E-cadherina	↑	T47-D, MCF7 y MDA-MB 468		Meng et al. 2000
I3C	PTEN	↑	T47-D, MCF7 y MDA-MB 468		Meng y col. 2000b
I3C	BRCA1	↑	T47-D, MCF7 y MDA-MB 468		Meng y col. 2000b
I3C	MUC1	↓	MCF7 y MDA-MB-468		Lee et al. 2004
PEITC	vimentina	↑	MDA-MB-231		Sakao et al. 2013
PEITC	vimentina	↓		Ratones MMTV-neu	Sakao et al. 2013
BITC	E-cadherina	↑	MDA-MB-231 y SUM159		Sehrawat y Singh 2011
BITC	vimentina	↓	MDA-MB-231 y SUM159		Sehrawat y Singh 2011
BITC	E-cadherina	↑	MCF7		Sehrawat y Singh 2011
BITC	E-cadherina	↑		ratones atímicos hembra	Sehrawat y Singh 2011
BITC	vimentina	↓		ratones atímicos hembra	Sehrawat y Singh 2011

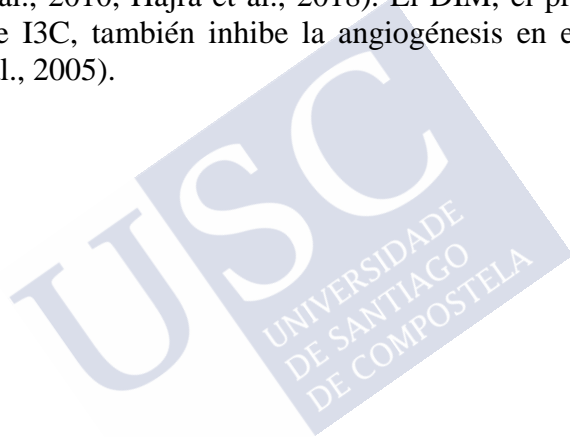
Cont. Tabla 7					
BITC	uPA y uPAR	↓	MDA-MB-231, SUM159 y MDA-MB-468		Sehrawat et al. 2013
BITC	FOXQ1	↓	MDA-MB-231, SUM159 y MDA-MB-468		Sehrawat et al. 2013
BITC	MMP2	↓		ratones hembra BALB / c	Kim et al. 2011B
BITC	MMP9	↓		ratones hembra BALB / c	Kim et al. 2011B
BITC	leptina	↓	MDA-MB-231 y MCF7		Kim et al. 2011

Elaboración propia. Abreviaturas: ↑: aumento de expresión o nivel de proteína, ↓: disminución de expresión o nivel de la proteína, BRCA1: gen 1 del cáncer de mama, FOXQ1: proteína Q1 de forkhead box, MMP: metaloproteinasas, PTEN: gen de la fosfatasa y homólogo de tensina, uPA: activador del plasminógeno de tipo uroquinasa, uPAR: receptor del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa.

- Aunque el tratamiento con antiandrógenos constituye la terapia estándar en el CP, las células tumorales pueden desarrollar resistencia a él. Ciertos ITCs pueden tener algunos efectos inhibidores sobre algunos de los principales mecanismos responsables de esta resistencia, como se muestra a continuación. Se postula que, debido a su capacidad de autorrenovación y diferenciación y resistencia a la apoptosis, las células madre en el CP podrían ser responsables no solo de la formación del cáncer, sino también de la progresión y metástasis. Es más, podrían ser resistentes a la quimioterapia y ser responsables de la recurrencia después del tratamiento (Labsch et al., 2014; Sharpe et al., 2019; Feitelson et al., 2015) y la resistencia al tratamiento supresor de andrógenos (Ojo et al., 2015). El SFN parece disminuir la capacidad de autorrenovación y crecimiento de estas células alrededor del 50% y el 80%, respectivamente (Labsch et al., 2014).

#### 1.3.1.6. Actividad antiangiogénica

A algunos ITCs se le atribuyen la inhibición de formación de vasos sanguíneos. Así parece que el PEITC tiene un efecto antiangiogénico intratumoral *in vivo* en ratas hembra Sprague Dawley con CM (Aras et al., 2013). Este efecto puede deberse a una reducción de la fosforilación de la proteína de unión del regulador 4E 1 (4E-BP1), un regulador de la angiogénesis (Syed Alwi et al., 2010). También, se considera que el SFN inhibe la proliferación de células endoteliales en ratones Balb/c hembra (Jackson et al., 2007). Otros ITCs como el BITC o el I3C inhiben el VEGF tanto *in vivo* como *in vitro* (Warin et al., 2010, Hajra et al., 2018). El DIM, el producto de condensación de I3C, también inhibe la angiogénesis en ensayos *in vivo* (Chang et al., 2005).





## 2. JUSTIFICACIÓN

Existen pocos estudios en la literatura sobre el efecto de ITCs en células de CM y CP. En una búsqueda rápida en Pub-Med de *SFN, I3C, Ib, AITC o PEITC and Breast cancer*, aparecen apenas, 129, 109, 1, 4 y 50 artículos respectivamente. Si revisamos con CP, los resultados serían similares, encontrando 91, 43, 2, 6, y 67 artículos con estas mismas moléculas. Esos estudios que fueron pormenorizados en el apartado de introducción, ofrecen resultados parciales y con falta de comparación entre todas las moléculas. Tampoco se han probado frente a la presencia de un quimioterápico habitual como el DOCE. Así mismo, son escasos los estudios en los que se verifica la toxicidad frente a células sanas (Hussain et al., 2013; Yiannakopoulou et al., 2014; Kilic et al. 2015; Flores-Pérez et al., 2016; Wang et al., 2015; Przystupski et al., 2019).

### 2.1. ¿CÓMO Y POR QUÉ REALIZAMOS EL ESTUDIO?

#### 2.1.1. Líneas celulares ensayadas

Como se ha indicado con anterioridad el CM se caracteriza por ser una enfermedad heterogénea en la que las células tumorales pueden expresar o no RE, RP o HER2, pudiendo llegar a ser TN; aspectos que condicionan la respuesta terapéutica, la evolución y el pronóstico de la enfermedad.

En base a lo anterior, en este trabajo de investigación se han empleado líneas celulares de CM que responden a distintos tipos

moleculares en base a la expresión de dichos receptores y de otros marcadores moleculares (Xiaofeng et al., 2017).

La línea celular más usada en el mundo para estudios de CM es la MCF7, que obtenida en 1973 (Soule et al., 1973); seguida de la MDA-MB-231 en 1974. (Cailleau et al., 1974). Ambas proceden de derrames pleurales en pacientes con CM metastásicos. La primera sirve como modelo cuando se realizan estudios sobre células de tipo luminal con RE positivos y la segunda es un modelo de célula TN. Esta última tampoco expresa marcadores epiteliales y sí marcadores mesenquimales como la vimentina (Mladkova et al., 2010). El siguiente tipo celular usado para la realización de esta tesis doctoral ha sido el T47D, también presenta los tres marcadores principales positivos, por lo que se comporta como una célula de tipo luminal con la diferencia de presentar características de tipo epitelial.

Estos tres tipos representan dos tercios de las líneas celulares usadas en los estudios actuales de CM *in vivo*, ya que suponen un buen exponente de los tipos de CM más vistos en la clínica. (Xiaofeng et al., 2017).

En cuanto al CP, las células ensayadas son: PC3, DU145. Ambas son andrógeno resistentes, no responden a a terapia hormonal y son metastaticas. En particular, las PC3 tienen características de cancer neuroendocrino extremadamente agresivo (Tai et al. 2011). En la practica clínica corresponde al subtipo más común de CPRCm AR (-). Las tasas de respuesta a las combinaciones de cisplatino/carboplatino con DOCE o etoposido son relativamente altas, pero no duraderas. En consecuencia, el pronóstico es muy pobre con una supervivencia media que puede variar de 12 meses a 36 meses. Por lo tanto, abordar el tratamiento del CP AR (-) se ha convertido en una necesidad clínica importante y urgente en el campo (Formaggio et al., 2021).

Las líneas celulares sanas de mama (HMEC, PCS-600-010) y de próstata son (PCS-440-010) se han empleado en ensayos de citotoxicidad de fármacos o compuestos cuando se requiere establecer el efecto citotóxico sobre células sanas. Este aspecto es importante ya

que se requiere establecer la eficacia terapéutica antitumoral minimizando los efectos citotóxicos sobre células sanas.

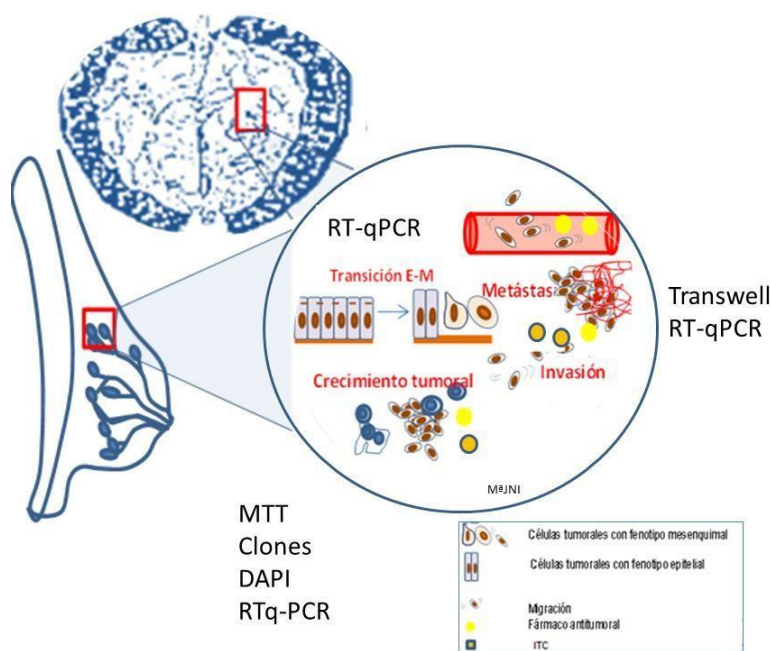
En la sección de material y método se hará un amplio resumen de sus características.

### **2.1.2. Moléculas ensayadas**

Las moléculas utilizadas en el estudio representan a los ITCs mayoritarios en los cultivos de brásicas y pertenecen a las tres clases de GS: SFN, AITC, 4PI e IB (ITC derivados de los GS alifáticos), I3C (indol derivado de un GS indólico) y PEITC (ITC derivado de un GS aromático).

Las técnicas de ensayo empleadas en esta tesis son técnicas estandarizadas en el ensayo de los efectos terapéuticos de moléculas/fármacos (véase el epígrafe de material y método). Las técnicas usadas son: actividad clonogénica y ensayo basado en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) para el estudio del crecimiento tumoral, técnica *transwell* para el estudio de la migración tumoral, la técnica con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) para la apoptosis y la PCR en tiempo real [*quantitative reverse transcription* PCR (RT-qPCR)] fue utilizada para el conocimiento del mecanismo de acción de estas moléculas en estos procesos.

Por tanto con estas técnicas se valoró la actividad de cada una de las moléculas tanto de forma aislada como de forma combinada con el DOCE, a distintas concentraciones, para observar su actividad en la cascada de acontecimientos de la carcinogénesis, como se puede observar en la Figura 4.



**Figura 4. Mecanismos de carcinogénesis sobre los que se ha estudiado el efecto de las moléculas ensayadas.** Abreviaturas: DAPI, 4', 6-diamidino-2-fenilindol; MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol; RT-qPCR, real time quantitative reverse transcription PCR

## 2.2. JUSTIFICACIÓN DEL USO DE DOCE

El DOCE es un taxano considerado de elección en el tratamiento del CM y de CP, aunque causante de graves efectos secundarios (Farha & Kasi, 2020). Actúa principalmente en la fase de mitosis del ciclo celular estimulando el ensamblaje de los microtúbulos y estabilizando su formación inhibiendo su despolimerización. Estos microtúbulos son muy estables y no funcionales, paralizando el ciclo celular en esta fase. También se ha demostrado su actuación a otros niveles como en la apoptosis (Jinho et al., 2016; De Iuliis et al., 2016; Oh et al., 2016), la angiogénesis o la EMT (He et al., 2015). Estas últimas actividades son de especial interés en la actualidad.

Por tanto si a lo largo de esta tesis demostramos que el tratamiento con DOCE combinado con alguno de estos compuestos mejora su acción, podría considerarse el uso de una dosis menor para conseguir el mismo efecto o incluso no usarlo y utilizar un compuesto natural, lo que de poderse extrapolar a la práctica clínica podría contribuir a disminuir los efectos secundarios de este compuesto.



## 3. OBJETIVOS

### 3.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la eficacia antitumoral de diferentes compuestos presentes en vegetales del género *Brassicaceae* (SFN, I3C, PEITC, IB, AITC) solos o en terapia combinada con DOCE, en comparación con DOCE, en células de CM (MCF7, MDA-MB-231 y T47D) y CP (PC3, DU145) bajo condiciones *in vitro*.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estudiar la actividad anti proliferativa de SFN, AITC, PEITC, IB e I3C, con y sin DOCE, sobre células de CM y de CP.
- 2) Estudiar el efecto de los ITCs sobre la sensibilización al DOCE células de CM y de CP.
- 3) Establecer la actividad anticlonogénica de los ITCs estudiados, con y sin DOCE, sobre las células de CM y de CP.
- 4) Determinar la actividad apoptótica de los ITCs estudiados, con y sin DOCE, sobre células de CM y de CP.
- 5) Evaluar la actividad citopática de los ITCs estudiados, con y sin DOCE, sobre células de CM y de CP.
- 6) Evaluar la actividad antimigratoria de los ITCs estudiados sobre células de CM y de CP.
- 7) Explorar mecanismos de acción que justifiquen posibles efectos de estas moléculas sobre la actividad proliferativa, apoptótica y antimigratoria de estas células tumorales así como la sensibilización a los efectos del DOCE y la expresión del fenotipo celular, mediante la técnica RT-qPCR.

## 4. MATERIAL Y MÉTODO

### 4.1. LÍNEAS CELULARES

Se emplearon líneas tanto celulares de CM humanas MDA-MB-231 (cat. No. HTB-26), MCF7 (cat. No. HTB-22) y T-47D (cat. No. HTB-133), como líneas celulares correspondientes a células epiteliales mamarias primarias sanas (HMEC, PCS-600-010). Todas ellas se obtuvieron de la *American Tissue Culture Collection* (ATCC) (Tabla 8).

Teniendo en cuenta que el CM es una enfermedad heterogénea, se han seleccionado dichas líneas celulares. Se consideran como líneas de referencia en estudios sobre CM (Hollestelle et al., 2010) (Tabla 9).

Las líneas celulares tumorales del CP son andrógeno insensibles (AI) y resistentes a la castración (RC) PC3 (nº de cat. CRL-1435) y DU145 (HTB-81, ATCC) y PEC sanas (PCAS-440-010). Se obtuvieron de ATCC (ATCC; Manassas, VA, EE. UU.) (Tabla 9).

Las líneas celulares PC3 y DU145 se derivan de metástasis óseas de adenocarcinoma de próstata humano de grado IV y metástasis cerebral de carcinoma de próstata, respectivamente.

A continuación se detallan las características de dichas líneas.

#### 4.1.1. Líneas celulares sanas

Estas líneas celulares se han empleado para verificar el potencial efecto citotóxico de los compuestos ensayados sobre células sanas correspondientes a los tejidos de mama y próstata.

##### 4.1.1.1. De mama

Se emplearon células epiteliales mamarias sanas (HMEC, PCS-600-010) cuyas características se indican en la Tabla 8.

##### 4.1.1.2. De próstata

Se utilizaron células sanas epiteliales de próstata, como se indica en la Tabla 8.

**Tabla 8. Características de las células sanas epiteliales de mama (HMEC, PCS-600-010) y de próstata (PCS-440-010).**

Organismo	Tejido	Tipo celular	Morfología	Propiedades de crecimiento	NB	Sexo
Homo sapiens, humano	Mama	Epitelial	Cuboidal	adherentes	1	Mujer
Homo sapiens, humano	Próstata	Epitelial	Cuboidal	adherentes	1	Varón

Elaboración propia. Fuente: ATCC® (American Type Culture Collection) [Base de datos en Internet], 2016. Abreviaturas: NB, nivel de bioseguridad.



## 4.1.2. Líneas celulares de CM

### 4.1.1.2. MCF7

Es una línea celular empleada como modelo universal para la investigación de CM. Es una línea sensible a E2 y dependen de E2 para proliferar. Expresan altos niveles de transcripciones RE $\alpha$  pero bajos niveles de RE $\beta$ . Por otro lado, la expresión de RP es elevada. La proliferación de las células de CM, está controlada no solo por RE y RP sino también por los R del factor de crecimiento asociado a la membrana plasmática. Dos miembros particularmente importantes de esta gran familia son el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que se activa mediante el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el HER2, ambos presentes en las células MCF7. Sin embargo, se considera que es una línea celular que expresa de forma moderada EGFR. Por otra parte, las células MCF7 presentan características de epitelio mamario diferenciado: son positivas para marcadores epiteliales, como E-cadherina,  $\beta$ -catenina y citoqueratina 18 (CK18), y negativas para marcadores mesenquimales, como vimentina y actina de músculo liso (AME). También mantienen la expresión de otros marcadores moleculares específicos de las capas epiteliales naturales, como las claudinas y la proteína 1 de la zona oculta (ZO-1), entre otras proteínas que constituyen las uniones intercelulares. Por otro lado, las células MCF7 son deficientes en CD44. Además, las células MCF7 muestran muchas características de las células epiteliales mamarias normales, incluida la capacidad de generar agregados 3D multicelulares que pueden madurar a esferoides que contienen luz. Los esferoides del linaje MCF7 se describen como una masa de células con núcleos desorganizados, fuertes enlaces de célula a célula y ausencia de formación de luz. La cadherina E es la proteína principal que media la adhesión de células MCF7 en los esferoides. Por otra parte, las células MCF7 tienen baja capacidad migratoria. Existe un circuito autocrino para que el VEGF induzca la migración/invasión de células de CM. Las células MCF7 expresan niveles más bajos de VEGF en relación con las células MDA-MB-231, que tienen altas capacidades invasivas y de migración (Comşa et al., 2015).

#### 4.1.2.2. T47D

La línea celular T47D es un modelo experimental ideal para dilucidar los efectos específicos de progesterona de un subtipo luminal A de CM. Esta línea celular difiere de la línea MCF7 en cuanto a nivel de transcriptómica, y la línea celular T47D es más sensible al progestágeno 1 (o progestina R5020) en presencia de estrógenos que la línea celular MCF7. Sirva como ejemplo que tras el tratamiento con progesterona, los genes 620 y 381 modifican su expresión al alza y hacia abajo, respectivamente, en la línea celular T47D, frente a 36 genes en la línea celular MCF7. Esto tiene lugar probablemente a través de la señalización del RP. El ER $\alpha$  y el PR son proteínas que se encuentran dentro de las células que median la señalización desde el exterior (la hormona esteroide estrógeno y progesterona, respectivamente) al nivel del ADN (genes diana) (Yu et al., 2017).

#### 4.1.2.3 MDA-MB-231

Procede de un paciente con adenocarcinoma ductal invasivo metastásico. Metastatiza preferentemente en huesos, cerebro y pulmones en modelos *in vivo*. Se emplean para la identificación de vías y genes mediadores de metástasis (Minn et al. 2005; Bos et al., 2009). Histológica y transcripcionalmente, tienen similitudes con CM BRCA1.

Las células MDA-MB-231 se caracterizan por ser TN, altamente agresivas, invasivas y poco diferenciadas ya que carecen de la expresión de RE y RP, así como de la amplificación de HER2 (Liu et al. 2003; Chavez et al. 2010).

Como resultado de la falta de expresión de RE y RP y de la amplificación de HER2, la línea celular fue inicialmente clasificada como una línea de CM basal. Sin embargo, actualmente se reconoce que pertenecen al subtipo de claudina-bajo ya que exhiben tanto baja regulación de claudina-3 y claudinina-4 como de la expresión del marcador de proliferación Ki-67, aumento de marcadores asociados con la

EMT y la expresión de características asociadas con células madre mamarias cancerosas (CMC) (p.e. el fenotipo CD44 + CD24-/low4) (Holiday & Speirs, 2011; Hero et al., 2019). Por otra parte, en determinadas condiciones de cultivo, las células muestran morfología endotelial (Harrell et al. 2014) y se distinguen por su fenotipo invasivo, caracterizado por proyecciones estrelladas que a menudo unen múltiples colonias celulares (Kenny et al. 2004).

#### **4.1.3. Líneas celulares de CP**

Tanto PC3 como DU145 se caracterizan por ser AI. Esta característica condiciona el comportamiento de las células tumorales ante los tratamientos convencionales (Namekawa et al., 2019) (Tabla 9). Por otra parte se tienen mayor resistencia a DOCE que otras líneas celulares de próstata como CWR22 and 22Rv1 (Burke et al., 2016; Toner et al., 2013).

##### **4.1.3.1. PC3**

Las células PC3 AI y proliferan normalmente en medios privados de andrógenos y poseen una mayor capacidad migratoria que otras líneas celulares de CP. Las células PC3 representan formas agresivas de adenocarcinoma de próstata (Seim et al., 2017; Saunus et al., 2018; Namekawa et al., 2019).

##### **4.1.3.2. DU145**

Las células DU145 son AI y consecuentemente proliferan normalmente en medios privados de andrógenos (Saunus et al., 2018; Namekawa et al., 2019).

Tabla 9. Características de las líneas celulares cancerígenas usadas en este estudio.

Línea celular	Tipo de tumor <sup>a</sup>	Procedencia	Pan-Can	IHC <sup>b</sup>	Tx-stc <sup>c</sup>	Dif. <sup>d</sup>	E. p53 <sup>c</sup>	ER/PR/HER2/RA <sup>f</sup>
MCF7	A,NST	Derrame pleural	Lum/HER2	A	Lum	Lum1	W	RE+/RP+/HER2-/RA+
T47D	A,NST	Derrame pleural	Lum/HER2	A	Lum	Lum2	m	RE+/RP+/HER2-/RA+
MDA-MB-231	A,NST	Derrame pleural	-----	C	Claudina baja	-----	m	RE-/RP-/HER2-/RA+
PC3	A	Metástasis ósea	-----	-----	-----	-----	m	RE-/RP-/AR-
DU145	A	Metástasis cerebral	-----	-----	-----	-----	m	RE-/RP-/RA-

Fuentes: Barretina et al., 2019; Bai et al., 2017; Bayala et al., 2020; GeneCraDS 2021; Gene NCBI, 2021; Goodspeed et al., 2016; *International Agency for Research on Cancer*. IARCTP53 database, 2021; Jiang et al., 2016; *The Broad Institute Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) 2021; Magklara et al., 2003; McLoughlin et al., 2020; Mota et al., 2017; Neve et al., 2006; Pan et al., 2016; Papadopoulos et al., 2009; Samus et al., 2018; Seim et al., 2019; Sweeney et al., 2012). Abreviaturas: A, adenocarcinoma; Dif., estado de diferenciación; E, estado; HER2, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano; IHC, Tipo Inmunohistoquímica; NST, No especificado de otra manera (adenocarcinoma ductal infiltrante); Pan-Can, *nanoString Pan Cancer Pathways panel*; RA, receptor de andrógenos; RE, Receptor de estrógenos; RP: Receptor de progesterona; w, tipo salvaje.

<sup>a</sup> Tipo de tumor, including morphology and/or histology based on International Diseases on oncology (ICD-O), *World Health Organization. International classification of diseases for oncology (ICD-O)-3rd edition, 1st revision and SNOMED*. C50-ICD-O topography. C61-ICD-O topography (CCLE, 2021; IARCTP53 database, 2021). <sup>b</sup> Tipo inmunohistoquímica: A, E-Cad+/Vim-/ER+/HER2+/AR+/EGFR+/; B, E-Cad+/Vim-/ER-/HER2+/AR+/EGFR+; C, E-Cad-/Vim+/ER-/HER2-/AR-/CK19+/EGFR+ (Saunus et al., 2018). <sup>c</sup> *International Agency for Research on Cancer* (IARC); <sup>e</sup> *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC) (Saunus et al., 2018; McLoughlin et al., 2020)]. <sup>f</sup> Nivel de expresión: MCF7, RE elevada/ RP elevada (CCLE, 2021), RA elevada (Bai et al., 2019); T47D, RP elevada Saunus et al., 2018; McLoughlin et al., 2020)]; RE, MCF7>T47D; RP, T47D>MCF7 (Seim et al., 2017); RA, MCF7>T47D>MDA-MB-231 (Seim et al., 2017)]; PC3, ER $\alpha$ -/ER $\beta$ -; DU145, ER $\alpha$ -/ER $\beta$ + (Saunus et al., 2018); PC3 RP-A and RP-B promotores metilados e inactivados; DU145 los tiene sin metilar y activos (Chamberlain et al., 1994).

## **4.2. CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO**

Para el CM las células se cultivaron de acuerdo con las recomendaciones de la ATCC. El medio de cultivo se complementó con 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin.

Para el CP las células se cultivaron de acuerdo con las instrucciones de ATCC con medio F-12K (cat. No. 30-2004) y el kit de crecimiento de células epiteliales de próstata (cat. No. PCAS-440-040) (ambas de ATCC) suplementado con 100 U / ml de penicilina y 100 mg / ml de estreptomycin (solución de penicilina-estreptomycin 30-2300; LGC Standards Barcelona, CAT, España).

## **4.3. TRATAMIENTOS**

Soluciones madre de AITC (nº de catálogo 36682, Sigma-Aldrich, Madrid, CM, España), 4PI (nº de catálogo I0444, TCI; París, Francia), PEITC (nº de catálogo 253731, Sigma-Aldrich, Madrid), CM, España), SFN (nº de cat. S4441, Sigma-Aldrich, Madrid, CM, España), IB (nº de cat. Ab141944, abcam, Cambridge, Reino Unido), I3C (nº de cat. I7256, Sigma -Aldrich, Madrid, CM, España) y DOCE (nº de catálogo 01885; Sigma-Aldrich, Madrid, CM, España) se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO; nº de catálogo D2650; Sigma-Aldrich, Madrid, CM, España) diluido con medio completo. Como control se añadió un volumen igual de DMSO (concentración final <0,05%).

El tratamiento con DOCE fue de 60,120 nM para las células MCF7, a 50,100 nM en el caso de las células MDA-MB-231 y T47D y, a 1 y 2 nM en el caso de las células PC3 y DU145.

Las dosis seleccionadas de ITCs para los ensayos de actividad antitumoral en células de CM y de CP se eligieron de acuerdo con los niveles de toxicidad en células de mama y de próstata sanas.

#### **4.4. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD**

Las células se disociaron con tripsina al 0,25%/EDTA 1 mM, se cultivaron durante la noche en placas de 96 pocillos ( $5 \times 10^3$ ) y se trataron con los tratamientos indicados previamente.

Después de la incubación en condiciones de cultivo estándar (37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>) durante 24, 48 o 72 h, se recolectaron las células y se evaluó el número de células viables usando el ensayo de MTT (Riss et al., 2016; Präbst et al., 2017).

#### **4.5. SENSIBILIZACIÓN FRENTE AL DOCE**

El efecto combinado entre DOCE y los ITCs se calculó mediante el índice de combinación como la relación de (valor esperado) / (valor observado). Una relación > 1 indicó un efecto sinérgico (Lee et al., 2005).

#### **4.6. ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS**

Para examinar los efectos citotóxicos del tratamiento durante un período prolongado de tiempo, se realizaron ensayos clonogénicos en las líneas celulares 14 días después del tratamiento. Las células se sembraron por cuadruplicado en placas de 6 pocillos y se trataron con los compuestos durante 14 días. Las células se observaron a diario durante el experimento (14 días). En el día 14, las colonias que contenían más de 50 células se contaron bajo un microscopio de contraste de fase. Finalmente, las colonias se tiñeron con cristal violeta (Franken et al., 2006; Jia et al., 2014; Hejchman et al., 2015; Wang et al., 2015) y se contaron a través del perfil de células del programa de análisis digital.

#### **4.7. ENSAYO DE APOPTOSIS**

Se sembraron las células ( $2 \times 10^4$ ) en cubreobjetos y después de la incubación durante toda la noche se administró el tratamiento recogido en el apartado 4.3. anteriormente.

Después de la incubación (a 37 °C durante 72 h), las células se lavaron con PBS. A continuación, se fijaron con paraformaldehído al 3%

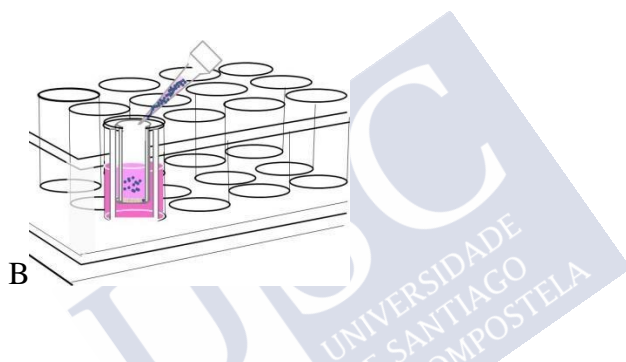
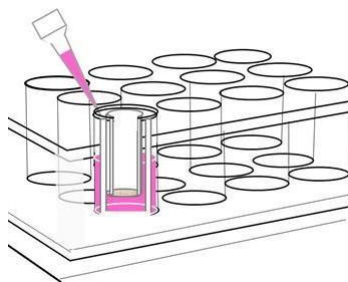
(1 hora a temperatura ambiente). Posteriormente se lavaron y se permeabilizaron [1% Triton X-100 (cat. No. 142314.1611142314.1611; Panreac, Barcelona, CAT, España), 4 minutos]. Después se lavaron nuevamente e inmediatamente se tiñeron [1  $\mu\text{g/ml}$ , 5 minutos con 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, cat. No. D9542; Sigma- Aldrich, Madrid, MD, España)]. Se empleó este último compuesto para la tinción pues conocido que DAPI forma complejos fluorescentes con ADN bicatenario.

Las células apoptóticas (con ADN condensado y fragmentado) se contaron bajo un microscopio de fluorescencia (40x) (Xiao et al. 2006). Se examinaron un mínimo de 300 células para cada tratamiento, y se calculó el porcentaje de células con signos apoptóticos (Ghanbari et al., 2014).

#### **4.8. ENSAYO DE MIGRACIÓN**

Se colocaron los insertos (Millicell cat. No. PIEP12R48; Merck Millipore Madrid, MD, España) en cada pocillo de placas microtiter de 24 pocillos. A continuación, se llenaron los pocillos con 600  $\mu\text{l}$  de medio completo con 10% de suero fetal bovino (FBS; Life Technologies, Madrid, MD, España) (Figura 5A). Inmediatamente, se sembraron en cada inserto las células de CM ( $1 \times 10^5$ ) suspendidas en 100  $\mu\text{l}$  de medio sin suero (Figura 5B). A continuación se administraron los tratamientos indicados en el punto 3.2 en el interior del inserto.

A



B

**Figura 5. Sembrado celular en los insertos de placas de 24 pocillos. (A)** Llenado con medio de cultivo de pocillo de la placa microtiter de 24 pocillos. **(B)** Sembrado celular en los insertos Millicel.

Después de una incubación de 72 h en condiciones estándar (a 37 °C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>), las células ubicadas en la superficie superior de las membranas se eliminaron con un bastoncillo de algodón ya que las células en la parte superior de las cámaras se consideraron no invasivas o no migratorias. Por el contrario, las células localizadas en las cámaras inferiores se consideraban invasivas.

Las membranas se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos, se tiñeron con cristal violeta (cat. No. C6158; Sigma-Aldrich, Madrid, MD, España) durante 15 minutos y finalmente, se observaron



con microscopio (Olympus, Tokio, Japón). La migración se determinó contando células, en cinco campos seleccionados al azar de al menos tres membranas de tres experimentos diferentes (Mao et al., 2013).

#### **4.9. CAMBIOS CITOPÁTICOS**

Se sembraron las células ( $1 \times 10^4$  células/pocillo) en cámaras de crecimiento (n° de cat. C6932; Sigma-Aldrich, Madrid, MD, España) y se incubaron con los compuestos en estudio durante 24 h a 37 ° C en una atmósfera humidificada, con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, el medio se reemplazó con medio completo nuevo que contenía ITCs y / o DOCE, de acuerdo con las dosis previamente indicadas y cultivadas durante 72 h. Luego, las células se tiñeron con solución de PBS que contenía colorante fluorescente CFDA-SE [éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína, cat. No. 1351201EDU; Bio-Rad Laboratories, Madrid, MD, España] a 1 mM durante 15 min. Luego, las células se lavaron con PBS, se fijaron (con etanol al 70% durante 5 min), se lavaron (PBS) y se tiñeron con Phalloidin-ATTO 1: 500 (Phalloidin-ATTO 647N, cat. No. 65906; Sigma-Aldrich, Madrid, MD, España) durante 1 h. Posteriormente, las células se lavaron con cloruro de sodio (NaCl, n° de cat. S7653; Sigma-Aldrich Madrid, MD, España) al 0,9% y finalmente, se tiñeron con DAPI a 1 µg / ml durante 10 minutos. Los portaobjetos se incrustaron en medio de montaje antifade Vecta Shield (cat. No. H-1000; Vector Laboratories, Burlingame, Ca, EE. UU.) Y los cambios citofáticos se analizaron bajo un microscopio confocal (x63, microscopio Leica TCS SP5 X, Leica Microsystems) (Hejchman et al., 2015).

#### 4.10. TÉCNICA DE RT-qPCR

Para determinar los mecanismos moleculares por los que los ITCs afectan a los parámetros anteriormente mencionados se realizó RT-qPCR.

Las células ( $1 \times 10^4$  células/pocillo) se cultivaron en cámaras (cat. no. C6932; Sigma-Aldrich, Madrid, MD, España) durante 24 h a 37 °C en condiciones estándar. Posteriormente, se cambiaron los medios por otro fresco con los tratamientos de ITCs y/o DOCE o sin tratamiento (controles) y se continuó el cultivo 72 h.

El ARN se aisló de las células mediante RNAspin Mini RNA Isolation Kit (Sigma-Aldrich). La reacción Real Time PCR se realizó con Fast Start SYBR Green Master (BioRad). Las condiciones de reacción fueron: precalentamiento a 95°C durante 3 min, 35 ciclos de 94°C durante 30 seg, 55–65°C durante 30 seg y 2°C durante 40 seg, seguido de 72°C durante 10 min. Se realizaron tres análisis independientes, y los cambios de expresión se normalizaron con GAPDH y se calcularon con el método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .

Las secuencias de cebadores fueron proporcionados por Sigma (Tabla 10).

**Tabla 10. Cebadores empleados en RT-q-PCR.**

Genes y sus mecanismos relacionados		Cebadores RT-qPCR (5'-3')
MRP1 Transportadores de fármacos Migración		Hacia atrás: F: TGTGGACGCTCAGAGGTTCA Hacia adelante: R: CATCGCCATCACAGCATTG
CYP3A4 Metabolismo de fármacos		Hacia atrás: F: GGGAAGCAGAGACAGGCAA Hacia adelante: R: AAGGGGTCTTGTGGATTGTTG
Topolla Gen diana		Hacia atrás: F: ATTCAGAGGGGATATGATTCGG Hacia adelante: R: GTTAAATACCAAGGGGCATA
Ciclo celular/apoptosis/migración	Bax	Hacia atrás: F: AGGATGCGTCCACCAAGAAG Hacia adelante: R: TGAAGTTGCCGTGAGAAAACA
	Bcl-2	Hacia atrás: F: ATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC Hacia adelante: R: GAGCAGAGTCTTCAGAGACAGCC
	p21	Hacia atrás: F: CCCGTGAGCGATGGAAC Hacia adelante: R: CGAGGCACAAGGGTACAAGA

Abreviaturas: BAX, BCL-2-associated X protein; Bcl2, proteína de la familia del linfoma de células B 2; CYP3A4: Citocromo p3A4; MRP1, *Multidrug resistance-associated protein* ; p21, (CDKN1A) cyclin dependent kinase inhibitor 1A; Topolla, Topipolimersa IIa.

#### 4.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentaron como medias  $\pm$  DE de al menos tres experimentos. La significancia de la diferencia entre variables entre control y diferentes tratamientos se estudió mediante t-test o ANOVA. Se consideró la diferencia significativa a  $P \leq 0,05$ .



## 5. RESULTADOS

A continuación se indican los resultados para cada objetivo específico formulado.

Los resultados correspondientes a CM forman parte de una publicación que está en fase de redacción.

Los resultados correspondientes a CP, para cada uno de los objetivos, se recogen en la publicación Núñez-Iglesias MJ, Novío S, García C, Pérez-Muñuzuri E, Soengas P, Cartea E, Velasco P, Freire-Garabal M. Glucosinolate-Degradation Products as Co-Adjuvant Therapy on Prostate Cancer in Vitro. *Int J Mol Sci.* 2019 9; 20(20):4977. DOI: 10.3390/ijms20204977. Esta publicación se incluye en el apartado de Anexos de esta memoria.

## **5.1. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 1): ESTUDIAR LA ACTIVIDAD ANTI PROLIFERATIVA DE SFN, AITC, PEITC, IB E I3C, CON Y SIN DOCE, SOBRE CÉLULAS DE CM Y DE CP.**

Para los ensayos con las células tumorales se han empleado ITCs a dosis que no presentaban efectos significativos ( $p > 0,05$ ) sobre la viabilidad celular de células sanas de mama y de próstata.

### **5.1.1. CM**

Se emplearon las dosis de los ITCs cuya afectación de la viabilidad células sanas oscilaba entre  $95 \pm 2,5$  y  $98 \pm 1,2$  a las dosis de: SFN 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$ ; AITC 1  $\mu\text{M}$  y 1,5  $\mu\text{M}$ ; PEITC 1  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ ; I3C 1  $\mu\text{M}$ -10  $\mu\text{M}$ .

Los efectos inhibidores de SFN, AITC y PEITC fueron célula dependiente. En el caso de las células de CM ER+, PR+, fue mayor el efecto antiproliferativo causado sobre las células MCF7 (Figuras 7, 9 y 12) que en las T47D (Figuras 7, 10 y 13). Las células de CM TN (MDA-MB-231) fueron menos sensibles a los efectos citotóxicos de los compuestos ensayados que las células de CM ER+, PR+ (Figuras 8, 11 y 14).

Los efectos de SFN (Figuras 6-8) sobre la proliferación celular fue tiempo dependiente en las células MCF7, T47D y MDA-MB-231.

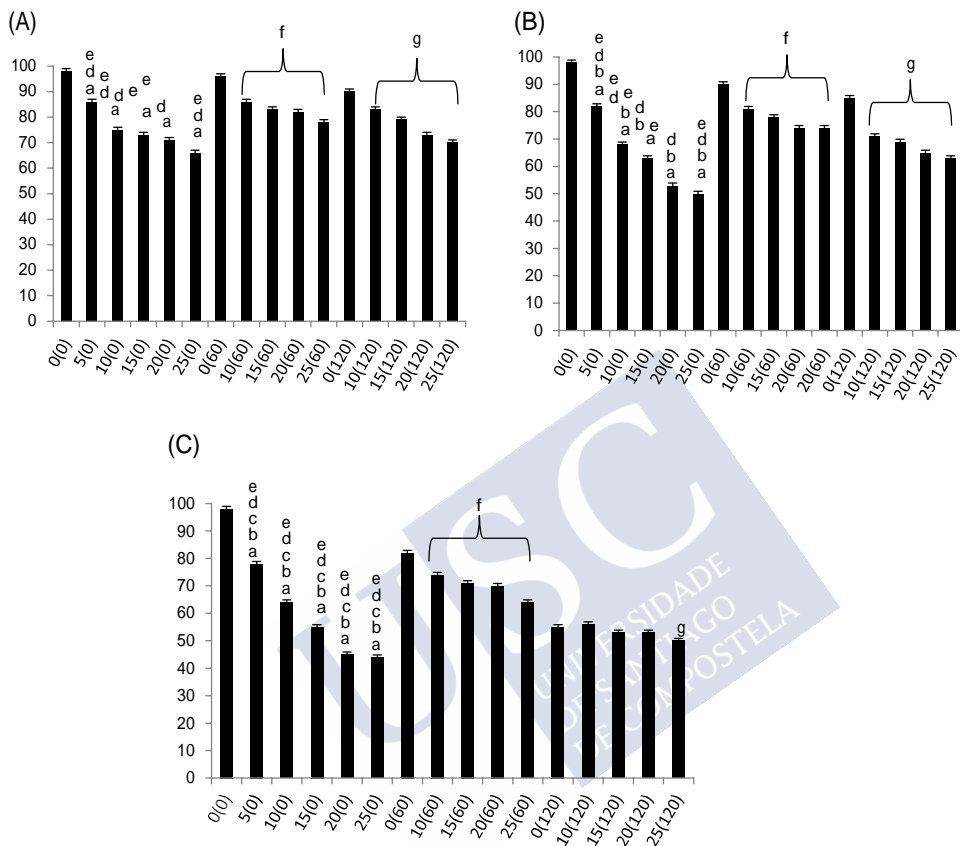
El efecto antiproliferativo del SFN era significativamente superior ( $p < 0,05$ ) en comparación con los demás ITCs estudiados. Sirva como ejemplo la inhibición de la proliferación inducida a la máxima dosis de SFN (25  $\mu\text{M}$ ) a las 72 horas fue 45% en células MCF7 (Figura 6) frente a un 10% de inhibición causado por el AITC a la máxima dosis (1,5  $\mu\text{M}$ ) en la misma línea celular a las 72 horas de tratamiento (Figura 9).

Por orden de mayor a menor el efecto antiproliferativo de los ITCs fue SFN>PEITC>AITC.

I3C no produjo efectos destacables ( $p>0,05$ ) sobre las líneas celulares ensayadas.

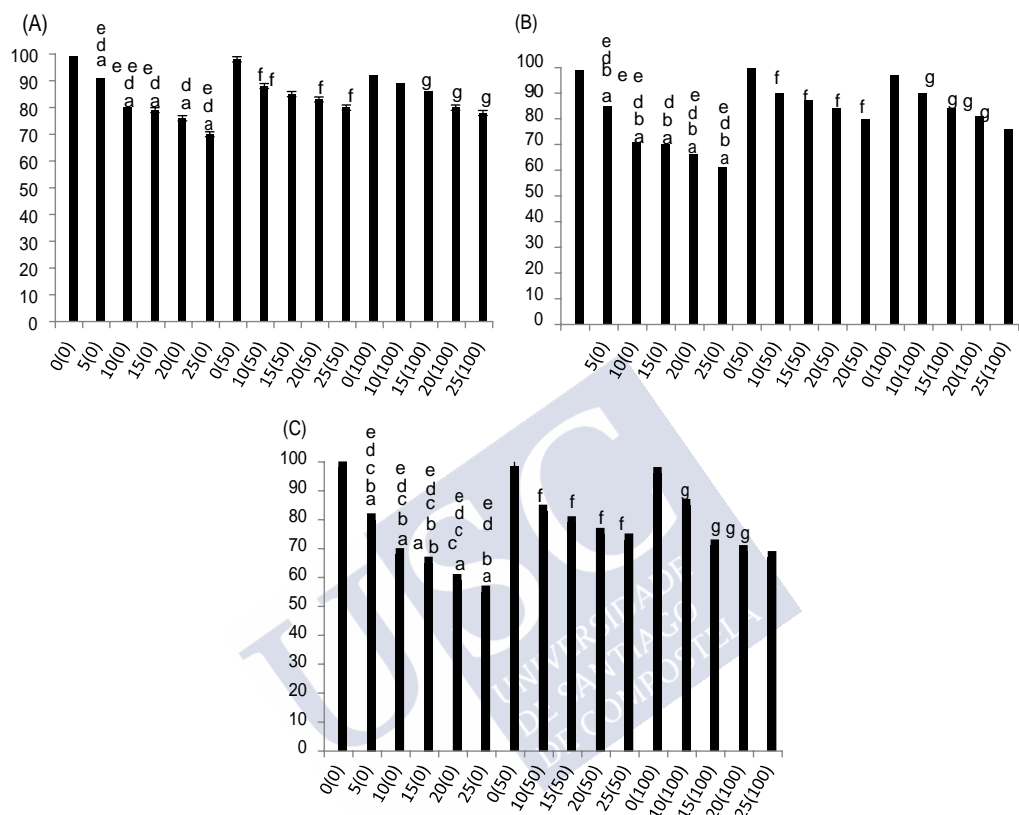
Al comparar el efecto antiproliferativo de los ITCs con el del DOCE se observó que:

- El SFN poseía un efecto antiproliferativo significativamente superior ( $p<0,05$ ) al del DOCE (60nM o 120 nM en células MCF7 y T47D (50nM y 100 nM en células T47D). Por ejemplo a las 72 horas el efecto antiproliferativo del SFN 25  $\mu$ M duplicaba el efecto del DOCE 60nM (Figura 6C) y de DOCE 50 $\mu$ M en células MCF7 y T47D, respectivamente (Figura 7C).
- En las células de CM TN (MDA-MB-231) el SFN a las dosis más altas (20 $\mu$ M y 25 $\mu$ M) poseía efecto antiproliferativo significativamente superior en comparación con DOCE a la dosis de 50nM (Figura 8A,8B y 8C).
- EL PEITC tras 72 horas de tratamiento a las dosis más elevadas presentaba mayor actividad antiproliferativa ( $p<0,05$ ) que el DOCE 60 nM o 50 nM en células MCF7, T47D y MDA-MB-231, respectivamente (Figuras 12C-14C).

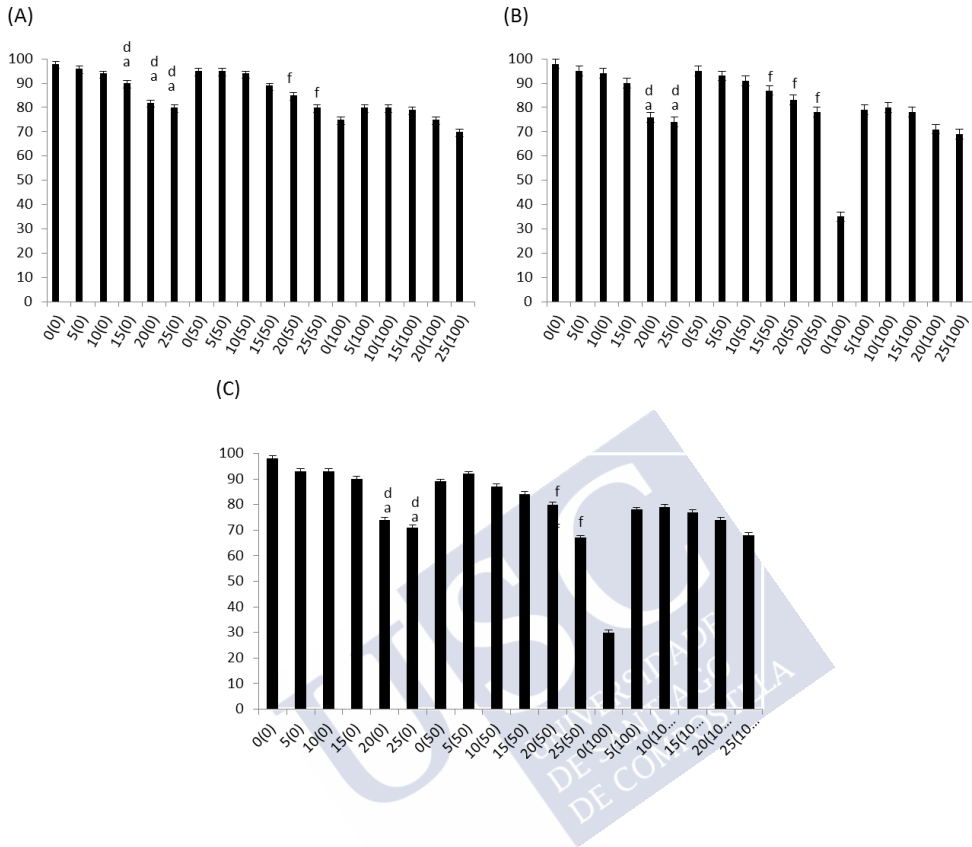


**Figura 6. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con SFN sobre la proliferación de células MCF7. A) 24 h, (B) 48 h y (C) 72 h. Columnas, media; barras DE (n=3). a,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN durante 24 h significativamente diferente en comparación con control; b,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN durante 48 o 72 h significativamente diferente en comparación con SFN durante 24 h; c,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN durante 72 h significativamente diferente en comparación con SFN durante 48 h; d,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN significativamente diferente en comparación con DOCE 60 nM; e,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN significativamente diferente en comparación con DOCE 120 nM; f,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado SFN + DOCE 60 nM significativamente diferente en comparación con DOCE 60 nM; g,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado SFN + DOCE 120 nM significativamente diferente en comparación con DOCE 120 nM (una vía ANOVA). Abreviaturas: DOCE, docetaxel; SFN, suforrafano.**

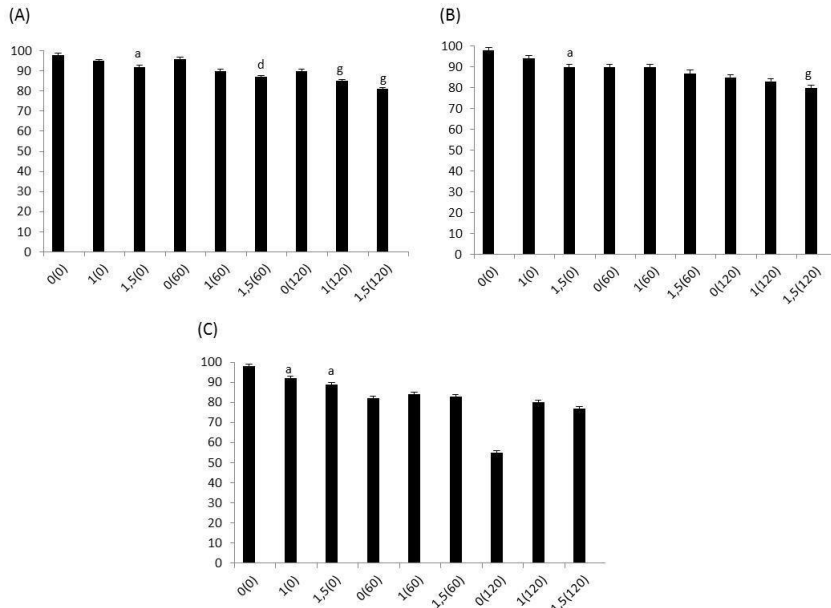




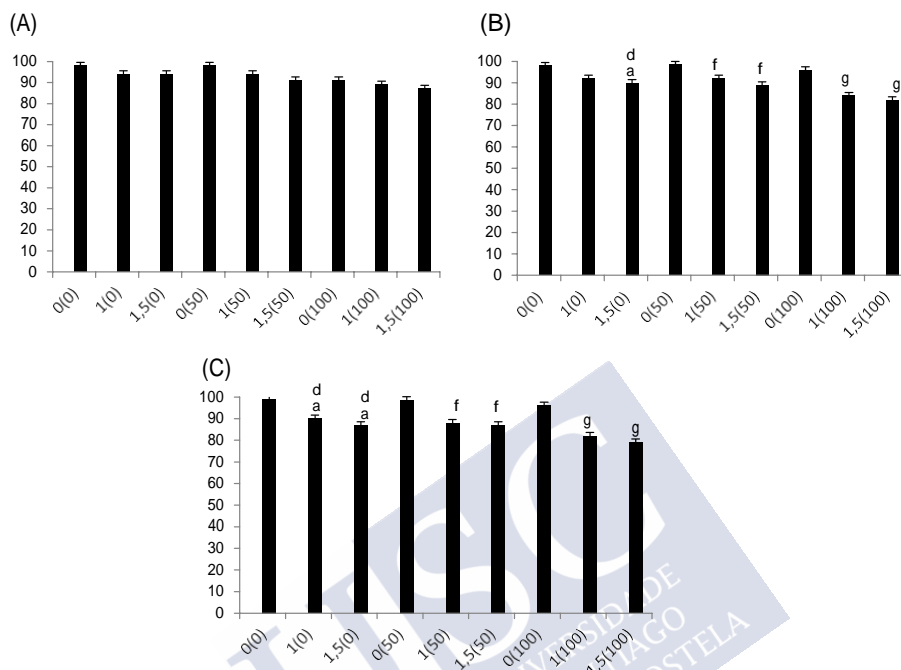
**Figura 7. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con SFN sobre la proliferación de células T47D.** A) 24 h, (B) 48 h y (C) 72 h. Columnas, media; barras DE (n=3). a,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN durante 24 h significativamente diferente en comparación con control; b,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN durante 48 o 72 h significativamente diferente en comparación con SFN durante 24 h; c,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN durante 72 h significativamente diferente en comparación con SFN durante 48 h; d,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN significativamente diferente en comparación con DOCE 50 nM; e,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN significativamente diferente en comparación con DOCE 100 nM; f,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado SFN + DOCE 50 nM significativamente diferente en comparación con DOCE 50 nM; g,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado SFN + DOCE 100 nM significativamente diferente en comparación con DOCE 100 nM (una vía ANOVA). Abreviaturas: DOCE, docetaxel; SFN, suforrafano.



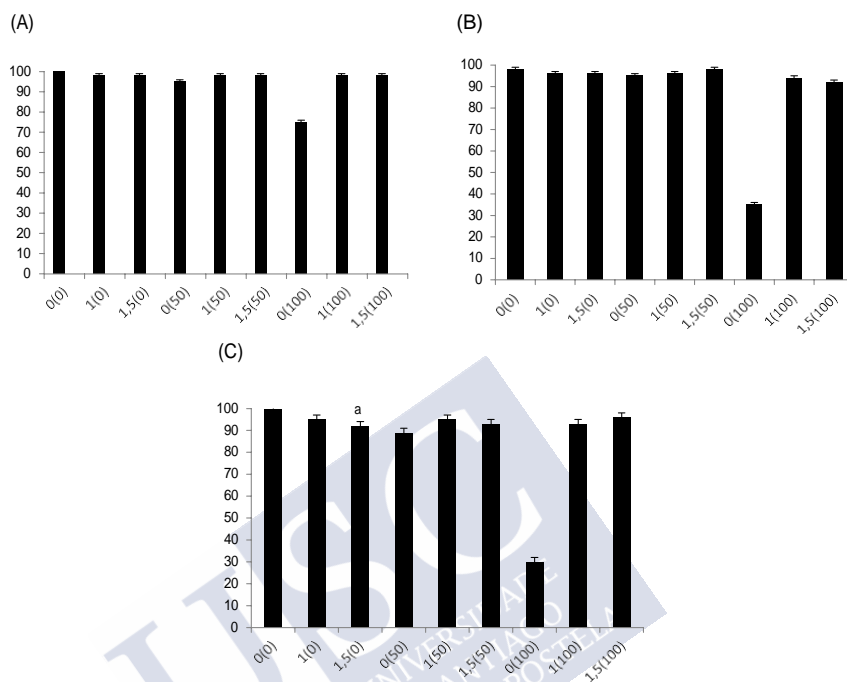
**Figura 8. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con SFN sobre la proliferación de células MDA-MB-231. (A) 24 h, (B) 48 h y (C) 72 h. Columnas, media; barras DE (n=3). a,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN durante 24 h significativamente diferente en comparación con control; b,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN durante 48 o 72 h significativamente diferente en comparación con SFN durante 24 h; c,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN durante 72 h significativamente diferente en comparación con SFN durante 48 h; d,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN significativamente diferente en comparación con DOCE 50 nM; e,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN significativamente diferente en comparación con DOCE 100 nM; f,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado SFN + DOCE 50 nM significativamente diferente en comparación con DOCE 50 nM; g,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado SFN + DOCE 100 nM significativamente diferente en comparación con DOCE 100 nM (una vía ANOVA). Abreviaturas: DOCE, docetaxel; SFN, suforrafano.**



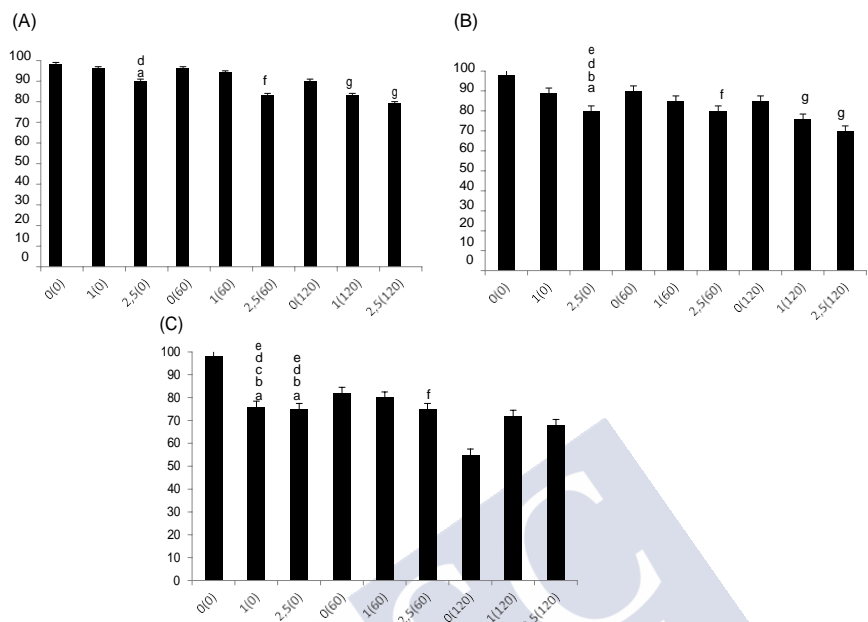
**Figura 9. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con AITC sobre la proliferación de células MCF7.** (A) 24 h, (B) 48 h y (C) 72 h. Columnas, media; barras DE (n=3). a,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN durante 24 h significativamente diferente en comparación con control; b,  $p < 0,05$ , tratamiento con AITC durante 48 o 72 h significativamente diferente en comparación con AITC durante 24 h; c,  $p < 0,05$ , tratamiento con AITC durante 72 h significativamente diferente en comparación con AITC durante 48 h; d,  $p < 0,05$ , tratamiento con AITC significativamente diferente en comparación con DOCE 60 nM; e,  $p < 0,05$ , tratamiento con AITC significativamente diferente en comparación con DOCE 120 nM; f,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado AITC + DOCE 60 nM significativamente diferente en comparación con DOCE 60 nM; g,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado AITC + DOCE 120 nM significativamente diferente en comparación con DOCE 120 nM (una vía ANOVA). Abreviaturas: AITC, alil isotiocianato; DOCE, docetaxel.



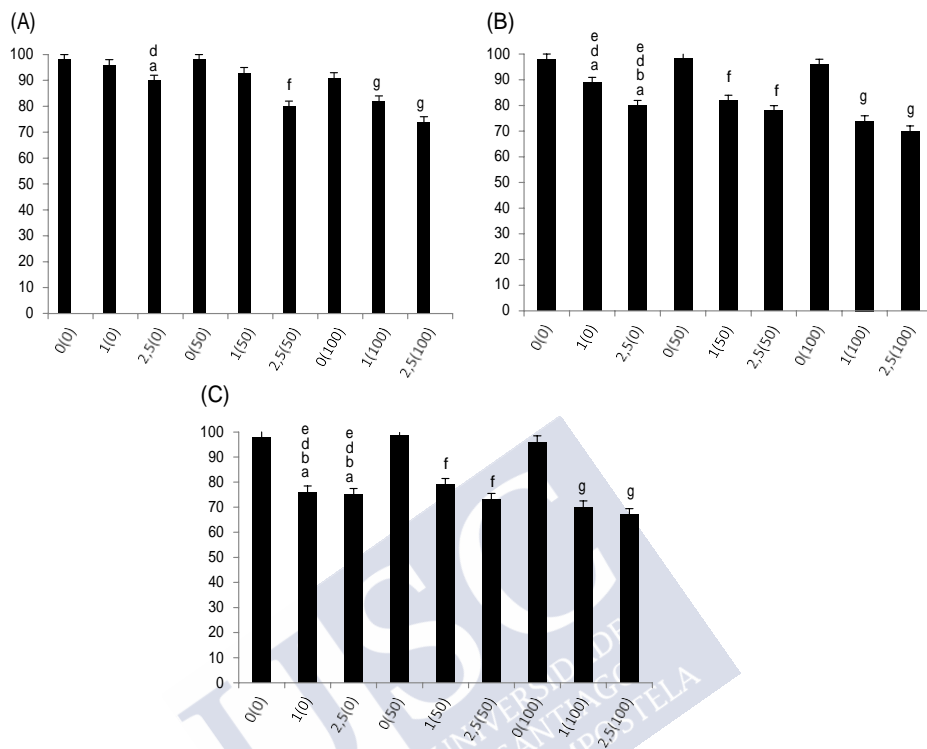
**Figura 10. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con AITC sobre la proliferación de células T47D.** (A) 24 h, (B) 48 h y (C) 72 h. Columnas, media; barras DE (n=3). a,  $p < 0,05$ , tratamiento con AITC durante 24 h significativamente diferente en comparación con control; b,  $p < 0,05$ , tratamiento con AITC durante 48 o 72 h significativamente diferente en comparación con AITC durante 24 h; c,  $p < 0,05$ , tratamiento con AITC durante 72 h significativamente diferente en comparación con SFN durante 48 h; d,  $p < 0,05$ , tratamiento con AITC significativamente diferente en comparación con DOCE 50 nM; e,  $p < 0,05$ , tratamiento con AITC significativamente diferente en comparación con DOCE 100 nM; f,  $P < 0,05$ , tratamiento combinado AITC + DOCE 50 nM) significativamente diferente en comparación con DOCE 50 nM; g,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado AITC + DOCE 100 nM) significativamente diferente en comparación con DOCE 100 nM (una vía ANOVA). Abreviaturas: AITC, alil isotiocianato; DOCE, docetaxel.



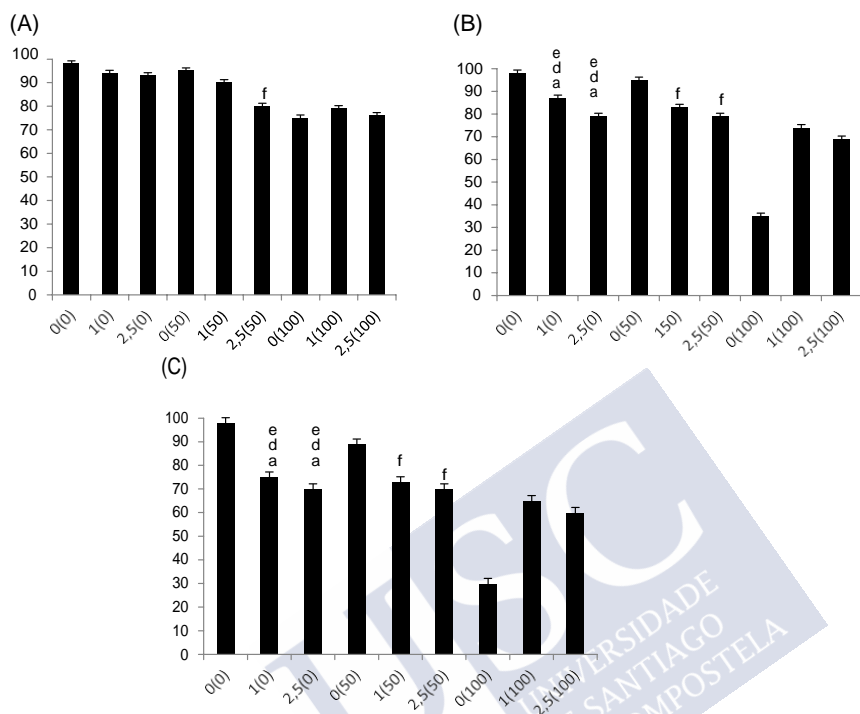
**Figura 11. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con AITC sobre la proliferación de células MDA-MB-231.** (A) 24 h, (B) 48 h y (C) 72 h. Columnas, media; barras DE (n=3). a,  $p < 0,05$ , tratamiento con AITC durante 24 h significativamente diferente en comparación con control; b,  $p < 0,05$ , tratamiento con AITC durante 48 o 72 h significativamente diferente en comparación con AITC durante 24 h; c,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN durante 72 h significativamente diferente en comparación con AITC durante 48 h; d,  $p < 0,05$ , tratamiento con AITC significativamente diferente en comparación con DOCE 50 nM; e,  $p < 0,05$ , tratamiento con AITC significativamente diferente en comparación con DOCE 100 nM; f,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado AITC + DOCE 50 nM) significativamente diferente en comparación con DOCE 50 nM; g,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado AITC + DOCE 100 nM) significativamente diferente en comparación con DOCE 100 nM (una vía ANOVA). Abreviaturas: AITC, alil isotiocianato; DOCE, docetaxel.



**Figura 12. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con PEITC sobre la proliferación de células MCF7.** (A) 24 h, (B) 48 h y (C) 72 h. Columnas, media; barras DE (n=3). a,  $p < 0,05$ , tratamiento con PEITC durante 24 h significativamente diferente en comparación con control; b,  $p < 0,05$ , tratamiento con PEITC durante 48 o 72 h significativamente diferente en comparación con PEITC durante 24 h; c,  $p < 0,05$ , tratamiento con PEITC durante 72 h significativamente diferente en comparación con PEITC durante 48 h; d,  $p < 0,05$ , tratamiento con PEITC significativamente diferente en comparación con DOCE 60 nM; e,  $p < 0,05$ , tratamiento con PEITC significativamente diferente en comparación con DOCE 120 nM; f,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado PEITC + DOCE 60 nM significativamente diferente en comparación con DOCE 60 nM; g,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado PEITC + DOCE 120 nM significativamente diferente en comparación con DOCE 120 nM (una vía ANOVA). Abreviaturas: DOCE, docetaxel; PEITC, fenetil isotiocianato.



**Figura 13. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con PEITC sobre la proliferación de células T47D.** (A) 24 h, (B) 48 h y (C) 72 h. Columnas, media; barras DE (n=3). a,  $p < 0,05$ , tratamiento con PEITC durante 24 h significativamente diferente en comparación con control; b,  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN durante 48 o 72 h significativamente diferente en comparación con PEITC durante 24 h; c,  $p < 0,05$ , tratamiento con PEITC durante 72 h significativamente diferente en comparación con PEITC durante 48 h; d,  $p < 0,05$ , tratamiento con PEITC significativamente diferente en comparación con DOCE 50 nM; e,  $p < 0,05$ , tratamiento con PEITC significativamente diferente en comparación con DOCE 100 nM; f,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado SFN + DOCE 50 nM significativamente diferente en comparación con DOCE 50 nM; g,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado PEITC + DOCE 100 nM significativamente diferente en comparación con DOCE 100 nM (una vía ANOVA). Abreviaturas: DOCE, docetaxel; PEITC, fenetil isotiocianato.



**Figura 14. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con PEITC sobre la proliferación de células MDA-MB-231.** (A) 24 h, (B) 48 h y (C) 72 h. Columnas, media; barras DE (n=3). a,  $p < 0,05$ , tratamiento con PEITC durante 24 h significativamente diferente en comparación con control; b,  $p < 0,05$ , tratamiento con PEITC durante 48 o 72 h significativamente diferente en comparación con PEITC durante 24 h; c,  $p < 0,05$ , tratamiento con PEITC durante 72 h significativamente diferente en comparación con PEITC durante 48 h; d,  $p < 0,05$ , tratamiento con PEITC significativamente diferente en comparación con DOCE 50 nM; e,  $p < 0,05$ , tratamiento con PEITC significativamente diferente en comparación con DOCE 100 nM; f,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado PEITC + DOCE 50 nM significativamente diferente en comparación con DOCE 50 nM; g,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado PEITC + DOCE 100 nM significativamente diferente en comparación con DOCE 100 nM (una vía ANOVA). Abreviaturas: DOCE, docetaxel; PEITC, fenetil isotiocianato,

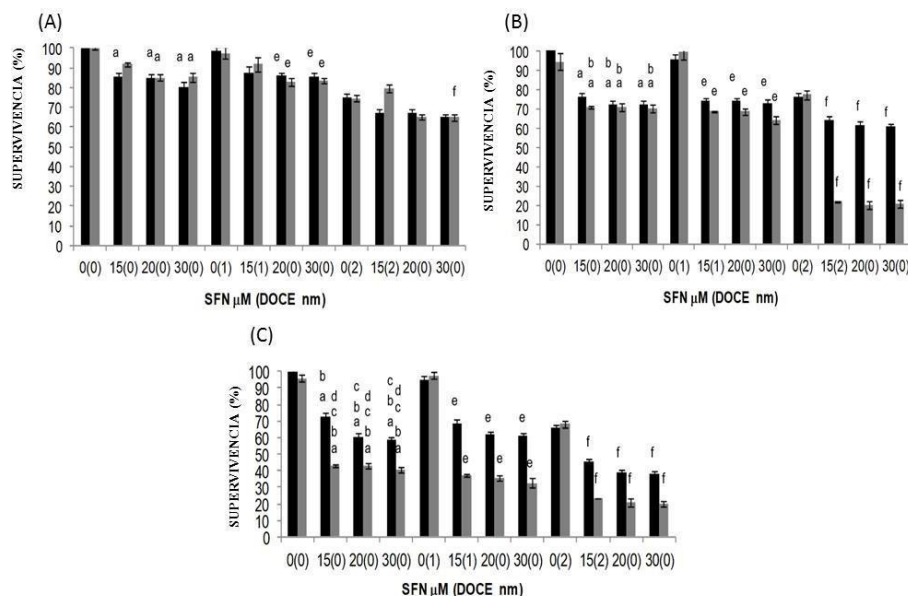


### 5.1.2. CP

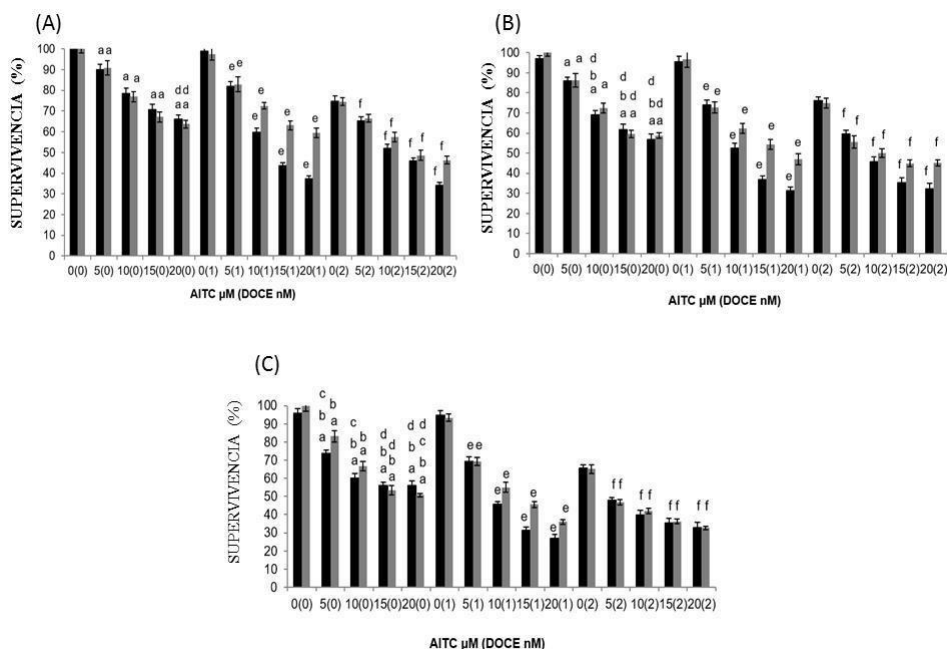
Las dosis de los ITCs se eligieron de acuerdo con los niveles de toxicidad en las células epiteliales de próstata. Dosis por encima de 30  $\mu\text{M}$  of SFN, 20  $\mu\text{M}$  of AITC, 4  $\mu\text{M}$  de PEITC, 500  $\mu\text{M}$  de 4PI, 30 de IB and 400  $\mu\text{M}$  de I3C disminuían la viabilidad de células sanas (diferencia  $p < 0,05$ ).

Todos los ITCs, excepto I3C y 4PI, redujeron la supervivencia de las células PC3 y DU 145. SFN, AITC e IB inhibieron la supervivencia de ambas líneas celulares de una manera dependiente de la concentración y del tiempo (Figuras 15,16 y 18), mientras que PEITC inhibió su supervivencia solo de una manera, dependiente de la concentración (Figura 17).

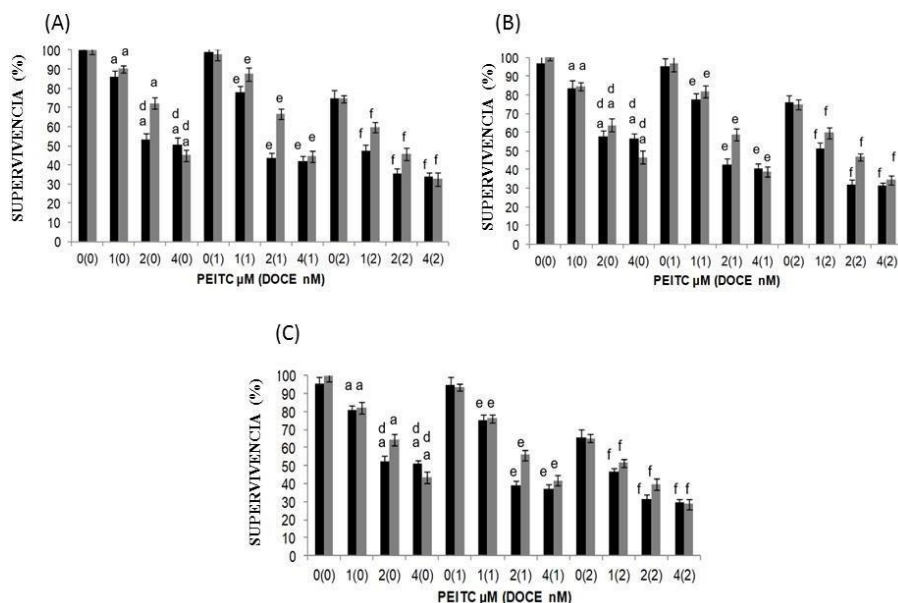
El efecto inhibitor inducido por AITC fue similar para ambas líneas celulares (Figura 16), sin embargo, los otros compuestos (Figuras 15,17 y 18) exhibieron efectos específicos de la célula o tuvieron una inhibición mayor en células PC3 y DU 145 que el DOCE. Por ejemplo, a la dosis máxima probada: 30  $\mu\text{M}$  de AITC (Figura 16) a las 24, 48 y 72 h redujeron la viabilidad de PC3 y DU145 en ~ 35%, ~ 40%, ~ 48%; 4  $\mu\text{M}$  de PEITC (Figura 17) a las 24 h, 48 h y 72 h redujeron la viabilidad de las células PC3 y DU145 en ~49% y ~55%, ~44% y ~54%, y ~49 y ~57% mientras que el DOCE 2 nM solo inhibió el crecimiento de estas células en ~ 25%, ~ 24% y ~ 34%, respectivamente.



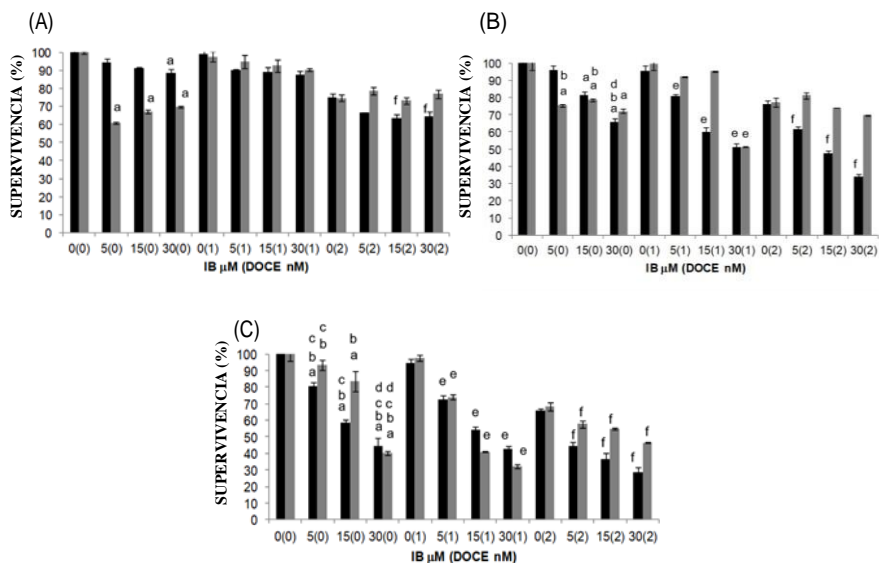
**Figura 15. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con SFN.** (A) 24 h, (B) 48 h y (C) 72 h sobre la proliferación de células PC3 (columna negro) y DU 145 (columna gris). Los datos se muestran como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. a,  $p < 0,05$ , el tratamiento con ITCs solo fue significativamente diferente en comparación con el tratamiento de control; b,  $p < 0,05$ , el tratamiento con ITCs solo durante 48 o 72 h es significativamente diferente en comparación con el tratamiento con ITCs solo durante 24 h; c,  $p < 0,05$ , el tratamiento con ITCs solo durante 72 h es significativamente diferente en comparación con el tratamiento con ITCs solo durante 48 h; d,  $p < 0,05$ , el tratamiento con ITCs solo fue significativamente diferente en comparación con DOCE 2 nM solo; e,  $p < 0,05$ , tratamiento de combinación (ITC + DOCE 1 nM) significativamente diferente en comparación con DOCE 1 nM solo; f,  $p < 0,05$ , tratamiento de combinación (ITC + DOCE 2 nM) significativamente diferente en comparación con DOCE 2 nM solo (ANOVA de una vía). Abreviaturas: DOCE, docetaxel; ITC, isotiocianato; SFN, sulforafano.



**Figura 16. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con AITC.** (A) 24 h, (B) 48 h y (C) 72 h sobre la proliferación de células PC3 (columna negro) y DU 145 (columna gris). Los datos se muestran como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. a,  $p < 0,05$ , el tratamiento con ITCs solo fue significativamente diferente en comparación con el tratamiento de control; b,  $p < 0,05$ , el tratamiento con ITCs solo durante 48 o 72 h es significativamente diferente en comparación con el tratamiento con ITCs solo durante 24 h; c,  $p < 0,05$ , el tratamiento con ITCs solo durante 72 h es significativamente diferente en comparación con el tratamiento con ITCs solo durante 48 h; d,  $p < 0,05$ , el tratamiento con ITCs solo fue significativamente diferente en comparación con DOCE 2 nM solo; e,  $p < 0,05$ , tratamiento de combinación (ITC + DOCE 1 nM) significativamente diferente en comparación con DOCE 1 nM solo; f,  $p < 0,05$ , tratamiento de combinación (ITC + DOCE 2 nM) significativamente diferente en comparación con DOCE 2 nM solo (ANOVA de una vía). Abreviaturas: AITC, alil isotiocianato; DOCE, docetaxel; ITC, isotiocianato.



**Figura 17. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con PEITC.** (A) 24 h, (B) 48 h y (C) 72 h sobre la proliferación de células PC3 (columna negro) y DU 145 (columna gris). Los datos se muestran como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. a,  $p < 0,05$ , el tratamiento con ITCs solo fue significativamente diferente en comparación con el tratamiento de control; b,  $p < 0,05$ , el tratamiento con ITCs solo durante 48 o 72 h es significativamente diferente en comparación con el tratamiento con ITCs solo durante 24 h; c,  $p < 0,05$ , el tratamiento con ITCs solo durante 72 h es significativamente diferente en comparación con el tratamiento con ITCs solo durante 48 h; d,  $p < 0,05$ , el tratamiento con ITCs solo fue significativamente diferente en comparación con DOCE 2 nM solo; e,  $p < 0,05$ , tratamiento de combinación (ITC + DOCE 1 nM) significativamente diferente en comparación con DOCE 1 nM solo; f,  $p < 0,05$ , tratamiento de combinación (ITC + DOCE 2 nM) significativamente diferente en comparación con DOCE 2 nM solo (ANOVA de una vía). Abreviaturas: DOCE, docetaxel; ITC, isotiocianato; PEITC, fenetil isotiocianato.



**Figura 18. Evolución temporal y dosis-respuesta de los efectos del tratamiento con IB.** (A) 24 h, (B) 48 h y (C) 72 h sobre la proliferación de células PC3 (columna negro) y DU 145 (columna gris). Los datos se muestran como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. a,  $p < 0,05$ , el tratamiento con ITCs solo fue significativamente diferente en comparación con el tratamiento de control; b,  $p < 0,05$ , el tratamiento con ITCs solo durante 48 o 72 h es significativamente diferente en comparación con el tratamiento con ITCs solo durante 24 h; c,  $p < 0,05$ , el tratamiento con ITCs solo durante 72 h es significativamente diferente en comparación con el tratamiento con ITCs solo durante 48 h; d,  $p < 0,05$ , el tratamiento con ITCs solo fue significativamente diferente en comparación con DOCE 2 nM solo; e,  $p < 0,05$ , tratamiento de combinación (ITC + DOCE 1 nM) significativamente diferente en comparación con DOCE 1 nM solo; f,  $p < 0,05$ , tratamiento de combinación (ITC + DOCE 2 nM) significativamente diferente en comparación con DOCE 2 nM solo (ANOVA de una vía). Abreviaturas: DOCE, docetaxel; IB, iberina; ITC, isotiocianato.

## **52. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 2): ESTUDIAR EL EFECTO DE LOS ITCs SOBRE LA SENSIBILIDAD AL DOCE CÉLULAS DE CM Y DE CP**

### **5.2.1. CM**

La terapia de combinación con ITCs y DOCE fue significativamente más eficaz sobre la viabilidad de las células CM en comparación con el tratamiento con ITCs o DOCE de forma celular dependiente.

El SFN, en todas las dosis ensayadas de SFN, en combinación con DOCE aumentó la sensibilidad al DOCE en células MCF7 tras el tratamiento durante 24 y 48 horas; ya sea en combinación con 60 nM o bien con 120 nM de DOCE. A las 72 horas de tratamiento se constató efecto sensibilizante frente al DOCE a la dosis de 60 nM. El efecto sensibilizante frente al DOCE se puede atribuir a mecanismos sinérgicos (tasa de supervivencia esperada/observada tasa de supervivencia > 1).

En el caso de las células T47D el tratamiento combinado de SFN y DOCE produjo efecto sensibilizante a los efectos citotóxicos del DOCE tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento, para todas las dosis estudiadas. Dicho efecto se puede explicar por mecanismos sinérgicos (tasa de supervivencia esperada/observada tasa de supervivencia > 1).

### **5.2.2. CP**

El efecto citotóxico de la terapia de combinación con ITCs y DOCE fue significativamente más eficaz ( $p < 0,05$ ) en comparación con el tratamiento con ITCs o DOCE solo. Este efecto se observó para ambas líneas celulares probadas, por lo que la sensibilización mediada por ITCs a la supresión del crecimiento por DOCE no fue una respuesta específica de la línea celular.

Al analizar los resultados mediante el método descrito anteriormente (ver apartado de material y método), en general, se observó que la mejora de la actividad antiproliferativa de DOCE mediada por ITCs en células

PC3 y DU 145 podía explicarse por mecanismos sinérgicos (tasa de supervivencia esperada/ observada tasa de supervivencia > 1). Sirvan como ejemplo los datos mostrados en las Tablas A1-A8 suplementarias recogidas del artículo que muestran parte de los resultados de esta tesis doctoral incluido en el Anexo (Núñez et al., 2019).

No se observó ningún efecto sinérgico para SFN en células PC3 a las 24 h y 48 h ni en células DU 145 a las 24 h, ni para IB en células DU 145 a las 24 y 48 h.

### **5.3. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 3): ESTABLECER LA ACTIVIDAD ANTICLONOGÉNICA DE LOS ITCs ESTUDIADOS, CON Y SIN DOCE, SOBRE LAS CÉLULAS DE CM Y DE CP**

#### **5.3.1. CM**

Una vez establecido el efecto de los ITCs ensayados sobre la actividad proliferativa en un periodo breve de tiempo (24, 48 y 72 horas) se evaluó el efecto inhibidor a largo plazo (14 días), mediante la prueba de formación de colonias.

Se analizó el efecto anticlonogenico del compuesto del SFN por ser el compuesto con mayor actividad antiproliferativa sobre las células de CM estudiadas.

El tratamiento con SFN en células MCF7 y T47D redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el potencial clonogénico en comparación con el control (Figura 19).

Por otra parte, se ha constatado que el tratamiento con SFN a las dosis de 20  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$  tenía mayor efecto anticlonogenico ( $p < 0,05$ ) que el tratamiento con DOCE 60 nM en células MCF7. Este mismo efecto se observó para las mismas dosis de SFN en comparación con el tratamiento con DOCE 50 nM en las células 747D.

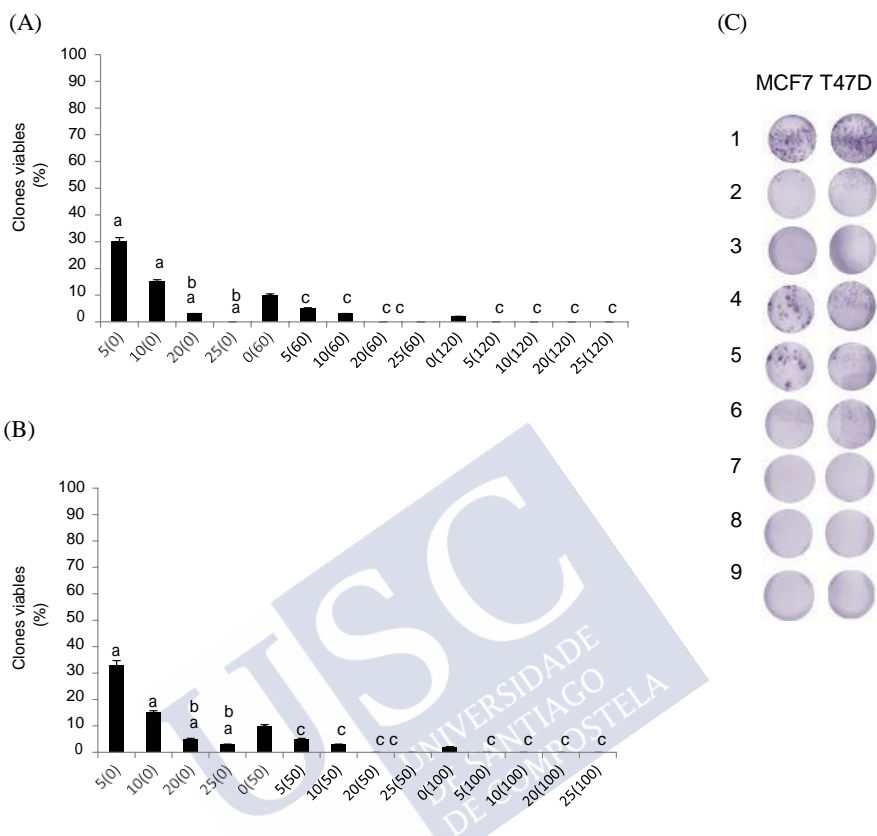
Es más, el tratamiento con 25  $\mu\text{M}$  de SFN inhibía por completo la actividad clonogenica en las células MCF7. Efecto que no producía el DOCE a ninguna de las dosis ensayadas (60nM y 120nM) en dichas células.

Al comparar el efecto del SFN sobre ambas líneas celulares ER+, PR+ (MCF7 y T47D) se constató que la dosis 25 $\mu\text{M}$  tenía mayor efecto sobre las células MCF7 que en células T47D. Así, tal y como muestra la Figura 19A a dicha dosis se inhibía por completo la formación de clones en las células MCF7 en tanto que aún se mostraba una actividad del  $\approx 5\%$ , con respecto al control en el caso de las células T47D (Figura 19B).

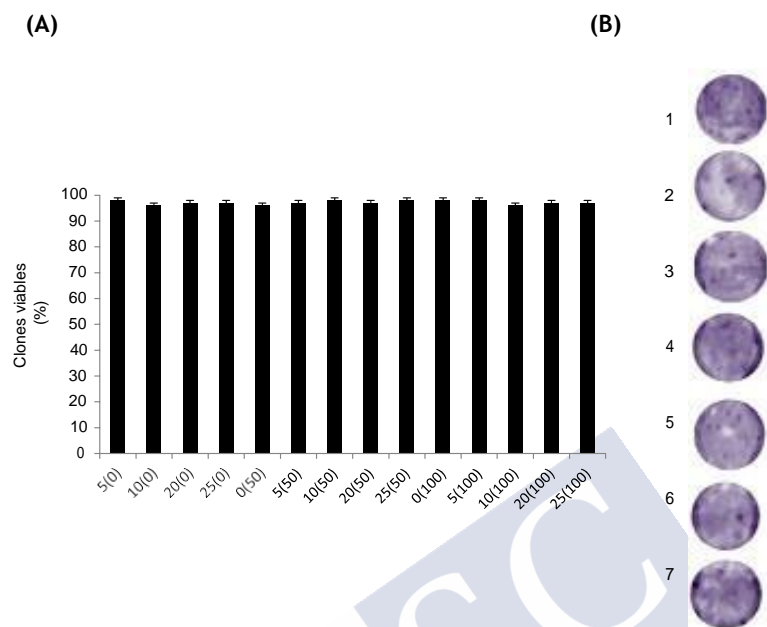
Por otra parte, la comparación del efecto del DOCE con respecto al efecto de SFN+DOCE mostró que el efecto de esta combinación era significativamente superior en relación con el DOCE en las células MCF7 (60nM y 120nM) y T47D (50nM y 100nM).

Cabe reseñar que el tratamiento combinado de SFN 20 $\mu\text{M}$  con DOCE 60nM o de SFN 25  $\mu\text{M}$  con DOCE 60 nM inhibía completamente la formación de clones en las dos líneas celulares en tanto que el DOCE no tenía dicho efecto. Así mismo el tratamiento combinado de SFN con DOCE 120 nM inhibía por completo la formación de clones para todas las dosis de SFN empleadas. Contrariamente, el DOCE 120 nM no producía dicho efecto.





**Figura 19. Efecto del SFN sobre la actividad clonogénica de células MCF7 y T47D (% de clones viables en relación al control).** (A) Clones viables de células MCF7 y (B) de T47D tras 14 días de tratamiento con SFN, DOCE o terapia combinada de ambos. Media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. a,  $p < 0,05$ , tratamiento con ITCs significativamente diferente en comparación con el tratamiento control; b,  $p < 0,05$ , tratamiento con ITCs significativamente diferente en comparación con DOCE; c,  $p < 0,05$ , tratamiento de combinación (ITC + DOCE nM) significativamente diferente en comparación con DOCE. (C) Imagen representativa mostrando clones viables en cultivos controles y a diferentes dosis de ITCs o en combinación con DOCE. 1, Control; 2, DOCE 60 y 50  $\mu$ M en células MCF7 y T47D, respectivamente; 3 DOCE 120 y 100  $\mu$ M en células MCF7 y T47D, respectivamente; 4, SFN 5  $\mu$ M; 5, SFN 10  $\mu$ M; 6, SFN 20  $\mu$ M; 7, SFN 25  $\mu$ M; 8, SFN 20  $\mu$ M + 120  $\mu$ M (MCF7) y SFN 20  $\mu$ M + 100  $\mu$ M (T47D); 9, SFN 25  $\mu$ M + 120  $\mu$ M (MCF7) y SFN 25  $\mu$ M + 100  $\mu$ M (T47D). Abreviaturas: DOCE, docetaxel; ITC, iostiocianato; SFN, sulforrafano.

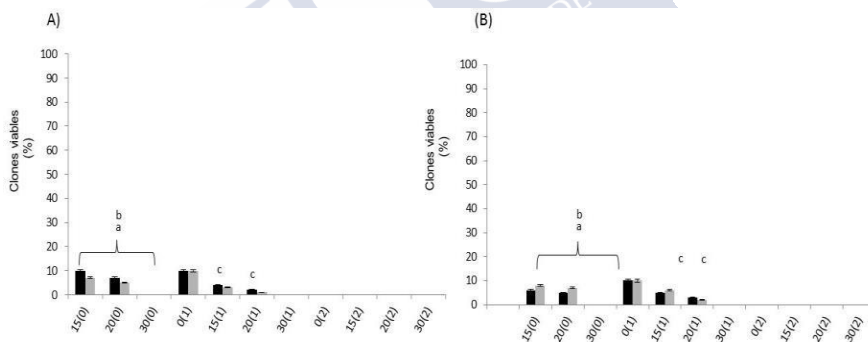


**Figura 20. Efecto de los tratamientos sobre la actividad clonogénica de células MDA-MB-231 (% de clones viables en relación al control).** (A) Clones viables tras 14 días de tratamiento con SFN, DOCE o terapia combinada de ambos compuestos. Los datos se muestran como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. (B) Imagen representativa mostrando clones viables en cultivos controles y a diferentes dosis de SFN o en combinación con DOCE. 1, Control; 2, DOCE 50  $\mu$ M; 3 DOCE 100; 4, SFN 5  $\mu$ M; 5, SFN 10  $\mu$ M; 6, SFN 20  $\mu$ M; 7, SFN 25  $\mu$ M; 7, SFN 25  $\mu$ M + 100  $\mu$ M). Abreviaturas: DOCE, docetaxel; ITC, iostiocianato; SFN, sulforrafano.

### 5.3.2. CP

Se verificó el efecto de los dos ITCs con mayor actividad antiproliferativa. Como puede verse en la Figura 21C, el tratamiento con 15  $\mu$ M y 20  $\mu$ M de SFN en células PC3 y DU145 redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el potencial clonogénico en comparación con el tratamiento control, DOCE 1 nM o DOCE 2 nM. Es de destacar que tratamiento con SFN 30  $\mu$ M o de AITC 30  $\mu$ M bloqueó drásticamente el potencial clonogénico de las células cancerosas PC3 y DU145 y no se observaron colonias.

Tras la terapia combinada con SFN 30 $\mu$ M+DOCE 1 nM o con AITC 30  $\mu$ M+DOCE 1 nM se inhibió por completo la actividad congénica mientras que el tratamiento con DOCE 1nM no producía dicho efecto. La terapia combinada de SFN o de AITC con DOCE 2 nM ocasionaba un efecto similar al de DOCE 2nM eliminando la actividad formadora de clones.



**Figura 21. Efecto de los tratamientos sobre la actividad clonogénica de células de CP (% de clones viables en relación al control).** Células PC3 (columna negra), células DU145 (columna gris). (A) Clones viables tras 14 días de tratamiento con SFN, DOCE o terapia combinada de ambos compuestos. (B) Clones viables tras 14 días de tratamiento con AITC, DOCE o terapia combinada de ambos compuestos. Los datos se muestran como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Columnas, media de tres determinaciones independientes; barras, SD. a,  $p < 0,05$ , SFN o AITC en comparación con el tratamiento control; b  $p < 0,05$ , tratamiento con SFN o AITC en comparación con tratamiento con DOCE; c,  $p < 0,05$ , tratamiento combinado (SFN + DOCE o AITC + DOCE) en comparación con el tratamiento DOCE. Abreviaturas: AITC, alil isotiocianato; DOCE, docetaxel; SFN, sulforafano.

## **54. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 4): ESTABLECER LA ACTIVIDAD APOPTÓTICA DE LOS ITCs ESTUDIADOS, CON Y SIN DOCE, SOBRE CÉLULAS DE CM Y DE CP**

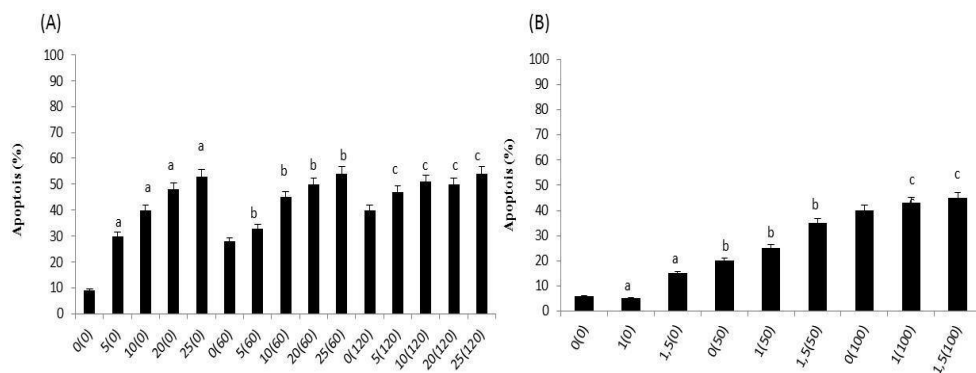
### **5.4.1. CM**

Se analizaron los efectos apoptóticos solo en aquellos compuestos tenían mayor efecto sobre la viabilidad de las células de CM. Esto es, SFN sobre células MCF7 y T47D. La muerte celular inducida por SFN puede atribuirse, al menos en parte, a mecanismos apoptóticos. Las células apoptóticas oscilaron entre 29,6% y 53,5% tras el tratamiento con SFN 5  $\mu$ M y SFN 25  $\mu$ M, respectivamente (Figura 22A).

Tras el tratamiento con DOCE los porcentajes de células apoptóticas fueron de ~ 28%, ~ 40%, ~18% y ~ 38%, para las las dosis de 60  $\mu$ M, 120  $\mu$ M (Figura 22A) 1 nM y 2 nM (Figura 22B), respectivamente.

La terapia de combinación con SFN+DOCE:

- Aumentó la eficacia del fármaco quimioterapico ( $p < 0,05$ ) a todas las dosis ensayadas.
- Duplicó el efecto del quimioterapico en algunas de las combinaciones ensayadas: SFN 25  $\mu$ M+DOCE 60 nM en células MCF7 (Figura 22B).SFN 1,5  $\mu$ M+DOCE 50 nM en células T47D) (Figura 22B).



**Figura 22. Cuantificación de células apoptóticas MCF7. (A) y T47D (B) (ensayo DAPI)** después de 72 h de tratamiento con SFN y/o docetaxel (DOCE). Los datos se muestran como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. a,  $p < 0,05$ , el tratamiento con SFN fue significativamente diferente en comparación con el tratamiento control; b,  $p < 0,05$ , tratamiento de combinación (SFN + 60 $\mu$ M en células MCF7 o SFN + DOCE 1 nM en células T47D) significativamente diferente en comparación con DOCE de dosis; c,  $p < 0,05$ ; d, tratamiento de combinación (SFN + 1200 $\mu$ M en células MCF7 o SFN + DOCE 2 nM en células T47D) significativamente diferente en comparación con DOCE (ANOVA de una vía). Abreviaturas: DAPI, PI, 4',6-diamidino-2-feenillindol; DOCE, docetaxel; SFN, suforrafano.

#### 5.4.2. CP

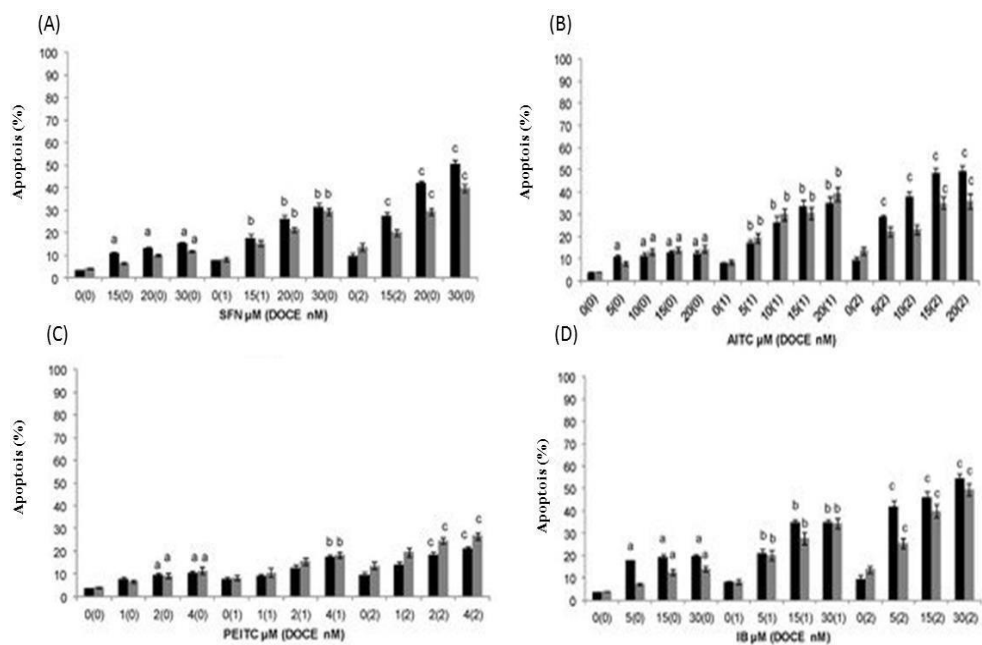
Los efectos apoptóticos solo se estudiaron para aquellos compuestos que habían tenido efecto reseñable sobre la viabilidad de las células CP PC3 y DU145. Es decir, AITC, SFN, PEITC e IB.

La muerte de las células PC3 y DU 145 mediada por AITC, IB, SFN y PEITC puede explicarse por mecanismos apoptóticos (19,7% y 14,09%, 15,32% y 11,83%, 12,3% y 14,43% y 10,31% y 11,39% de células apoptóticas con la dosis más alta de IB, SFN, AITC y PEITC, para células PC3 y DU 145, respectivamente).

Cuando las líneas celulares PC3 y DU 145 se trataron con DOCE, los porcentajes de células apoptóticas fueron de hasta ~ 9% (DOCE 1nM) y ~ 14% (DOCE 2nM) para las células PC3 y DU 145, respectivamente.

La terapia de combinación con ITCs aumentó de forma significativa ( $p < 0,05$ ) la eficacia del fármaco quimioterápico en ambas líneas celulares (Figura 23A-23D).

Es más, la combinación de SFN 30  $\mu$ M+ DOCE 1 nM y de SFN 20  $\mu$ M+ DOCE 1nM (Figura 23A) o bien de AITC 20  $\mu$ M+ DOCE 1 nM y de AITC 20  $\mu$ M+ DOCE 1nM (Figura 23B) cuadruplicaba el efecto apoptótico del DOCE 1nM en células PC3 y DU145, respectivamente. Así mismo, en las células PC3 la combinación de SFN 30 $\mu$ M+ DOCE 2nM y de AITC 20 $\mu$ M+ DOCE 2nM triplicaba el efecto apoptótico del DOCE 2 nM. Un efecto similar se observó tras el tratamiento combinado de IB+DOCE en comparación con DOCE (Figura 23D).



**Figura 23. Cuantificación de células apoptóticas de CP.** PC3 (columna negra) y DU 145 (columna gris) (ensayo DAPI) después de 72 h de tratamiento con SFN (A), AITC (B), PEITC (C), IB (D) y/o DOCE. Los datos se muestran como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. a,  $p < 0,05$ , el tratamiento con ITCs (isotiocianato) solo fue significativamente diferente en comparación con el tratamiento de control; b,  $p < 0,05$ , tratamiento de combinación (ITC + DOCE 1 nM) significativamente diferente en comparación con DOCE de dosis baja solo; c,  $p < 0,05$ , tratamiento de combinación (ITC + DOCE 2 nM) significativamente diferente en comparación con DOCE de dosis alta solo (ANOVA de una vía). Abreviaturas: AITC, alil isotiocianato; IB, iberina; DAPI, PI, 4',6-diamidino-2-feenillindol; DOCE, docetaxel; PEITC, fenetilisotiocianato; SFN, suforrafano.

## **55. EVALUAR LA ACTIVIDAD CITOPÁTICA DE LOS ITCs ESTUDIADOS, CON Y SIN DOCE, SOBRE CÉLULAS DE CM Y DE CP**

### **5.5.1. CM**

Se examinamos los cambios citopáticos en las células MCF7 por ser las más sensibles a los efectos de las moléculas testadas. En ausencia de tratamiento (grupo control) las células se caracterizaron morfología alargada, núcleos elipsoides con eucromatina y heterocromatina, filamentos de actina localizados principalmente debajo de la membrana plasmática y citoplasma teñido de manera homogénea con CFDA-SE. Sin embargo, en las células tratadas con SFN, DOCE o SFN+DOCE se constataba cambio de a morfología hacia una forma redondeada y cambios en la organización de la actina.

### **5.5.2. CP**

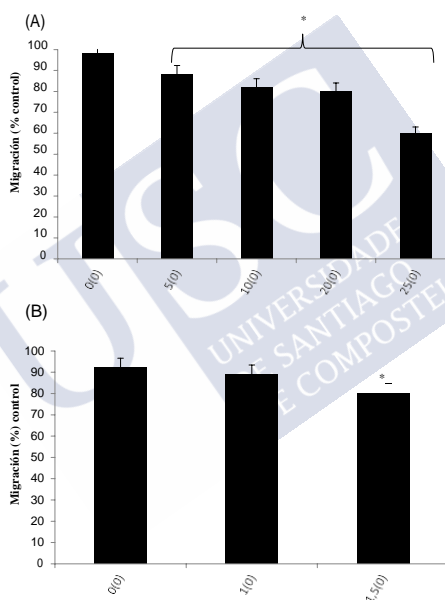
Para explorar el papel de SFN, AITC, PEITC e IB, en el daño celular en las células CP, examinamos los cambios citopáticos en las células PC3. En las células control las características celulares fueron morfología elongada con nucleos de forma elíptica, mostrando tinción homogénea del citoplasma. Las células tratadas con AITC 20  $\mu$ M, IB 30  $\mu$ M, SFN 30  $\mu$ M, PEITC 4  $\mu$ M y/o DOCE 2 nM mostraron una forma redondeada como fenotipo predominante y reorganización del esqueleto de actina. En la publicación que recoge parte de los resultados incluidos en esta memoria de tesis doctoral y que consta el Anexo se pueden apreciar las características celulares mediante microscopía confocal (Figura 4, pág 6 artículo Núñez et al., 2019).



## 5.6. PARA EL OBJETIVO ESPECÍFICO 6): EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIMIGRATORIA DE LOS ITCs ESTUDIADOS SOBRE CÉLULAS DE CM Y DE CP

### 5.6.1. CM

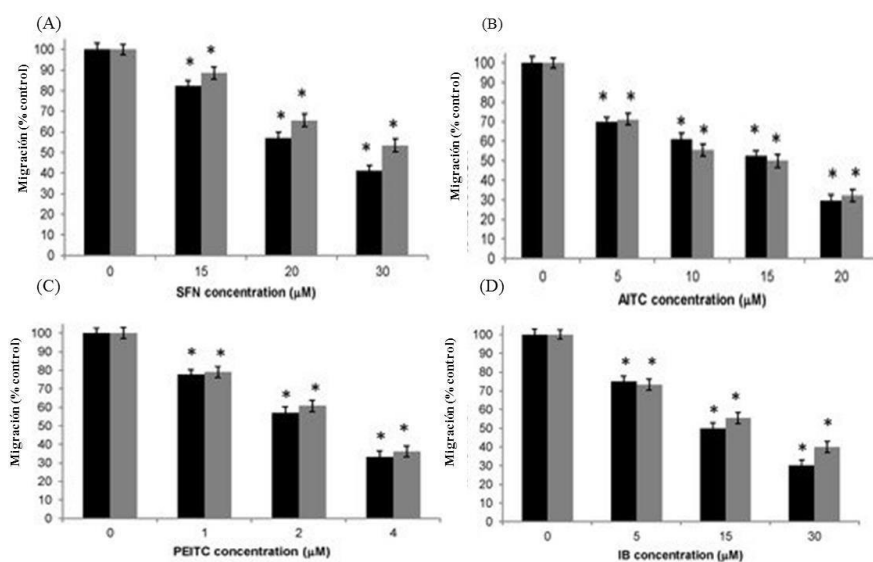
El tratamiento con SFN o AITC redujo de forma significativa ( $p < 0,05$ ) la capacidad migratoria de las células MC7 en relación a los controles (Figura 24). La reducción de la capacidad migratoria celular alcanzó el 40% en relación al control para la mayor dosis de SFN ( $25\mu\text{M}$ ).



**Figura 24. Inhibición de la migración celular de células MCF7. (A) SFN, (B) AITC.** Las células de CM se trataron con SFN. Los datos se muestran como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* El tratamiento con SFN fue significativamente diferente en comparación coSFN, sulforrafano.n el tratamiento de control ( $p < 0,05$ ). Abreviaturas: AITC, alil isotiocianato; CM, cáncer de mama; SFN, sulforafano.

### 5.6.2. CP

La capacidad de migración de las células PC3 y DU 145 disminuyó de forma significativa tras 72 horas de tratamiento con SFN, AITC, PEITC e IB en comparación a las células cancerígenas sin tratamiento (Figura 25). Dicho efecto es dosis-dependiente; alcanzándose una reducción de la capacidad migratoria que era de  $\approx 40\%$  y  $\approx 55\%$  en el caso de las células PC3 y DU145, respectivamente cuando habían sido tratadas con SFN 30  $\mu\text{M}$ .



**Figura 25.** Inhibición de la migración celular de células de CP. PC3 (columna negra) y DU 145 (columna gris) por los ITC. Las células de cáncer de próstata se trataron con SFN (A), AITC (B), PEITC (C) e IB (D). Los datos se muestran como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. \* El tratamiento con ITCs fue significativamente diferente en comparación con el tratamiento de control ( $p < 0,05$ ). Abreviaturas: AITC, alil isotiocianato; IB, iberina; ITC, isotiocianato; PEITC, fenetil isotiocianato; SFN, sulforafano

## **5.7 EXPLORAR MECANISMOS DE ACCIÓN QUE JUSTIFIQUEN POSIBLES EFECTOS DE ESTAS MOLÉCULAS SOBRE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA, APOPTÓTICA Y ANTIMIGRATORIA DE ESTAS CÉLULAS TUMORALES ASÍ COMO LA SENSIBILIZACIÓN A LOS EFECTOS DEL DOCE Y LA EXPRESIÓN DEL FENOTIPO CELULAR, MEDIANTE LA TÉCNICA RT-qPCR**

Se analizaron diferentes genes (p21 BAX, Bcl2, MPR1) implicados en la proliferación celular, apoptosis, EMT y sensibilización/resistencia a fármacos quimioterápicos (Abbas et al., 2009; Li et al., 2014; Liao et al., 2014; Westphal et al., 2014; Delbridge et al., 2015; Kalkavan et al., 2019; Genecards 2021; Gene NCBI 2021). Los valores superiores a uno se consideraron positivos en comparación con las células tratadas con el control.

### **5.7.1. CM**

Como se indica con anterioridad el ITCs que muestra mayor eficacia antitumoral en CM es SFN en células MCF7. De ahí que los mecanismos moleculares se analizasen mediante RT-q PCR en estas células, tratadas con SFN solo o en combinación con SFN+DOCE para su comparación con el tratamiento control o con DOCE solo.

La función molecular de p21 o CDKN1A (*Cyclin dependent kinase inhibitor 1A*) es principalmente la actividad inhibidora de la proteína serina/treonina quinasa dependiente de ciclina. Las funciones biológicas incluyen la detención del ciclo celular, la regulación negativa del crecimiento celular, contribuir a la apoptosis por la vía de señalización apoptótica intrínseca e inhibir la EMT (Li et al., 2014; Shamloo & Usluer, 2019; Genecards 2021; Gene NCBI 2021).

En este estudio hemos constatado que tras el tratamiento con SFN aumentó p21 3,87 veces ( $p < 0,05$ ) en relación al control.

Además, el tratamiento combinado de SFN+DOCE (25µM+120nM) incrementó la expresión de p21 2,95 veces ( $p > 0,05$ )

con respecto al control y 2,03 veces ( $p<0,05$ ) en relación al tratamiento con DOCE (120nM).

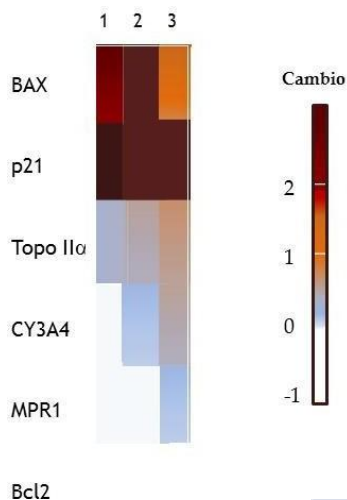
Entre las funciones moleculares de BAX se incluyen la unión al dominio BH3. Entre las fisiológicas se incluyen la activación de la endopeptidasa de tipo cisteína implicada en procesos apoptóticos y en cambios mitocondriales apoptóticos (Genecards, 2021; Gene NCBI 2021) y en la inhibición de la EMT (Kim et al., 2018). En este último por causar inhibición de Bcl2 (Kim et al., 2018) inducen la liberación de citocromo C que causa disfunción mitocondrial (Westphal, et al., 2011). Además BAX participa en la inhibición de la EMT (Kim et al., 2018) por causar inhibición de Bcl2 (Kim et al., 2018).

En este estudio hemos observado que el tratamiento con SFN incrementaba la expresión de BAX 2,9 ( $p<0,05$ ) respecto a control y 3,4 veces ( $p<0,05$ ) respecto al tratamiento con DOCE. Así mismo, la expresión de BAX aumento 1,5 veces ( $p<0,05$ ) tras el tratamiento con SFN+DOCE en comparación con DOCE.

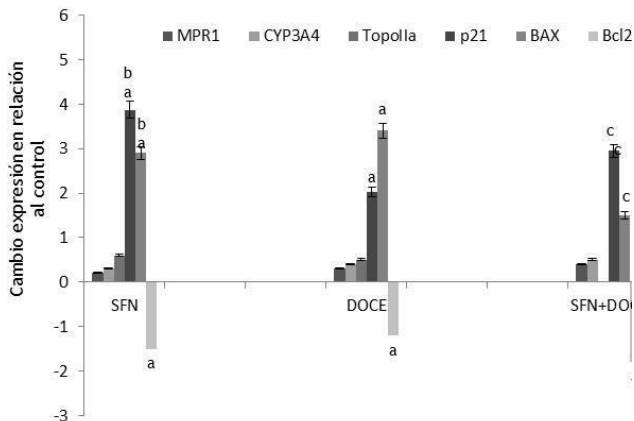
Contrariamente, hemos observado que el tratamiento con SFN disminuía la expresión de Bcl2 con respecto al control (1,5 veces), al tratamiento con DOCE (1,2 veces). Por otra parte, el tratamiento con SFN+DOCE disminuía (1,8 veces,  $p<0,05$ ) la expresión de Bcl2 en relación al tratamiento con DOCE.

Los tratamientos con SFN, DOCE o SFN+DOCE no modificaron de forma significativa la expresión de MPR1, TopoII $\alpha$  ni de CY3A4 con respecto control ni al SFN+DOCE.

(A)



(B)

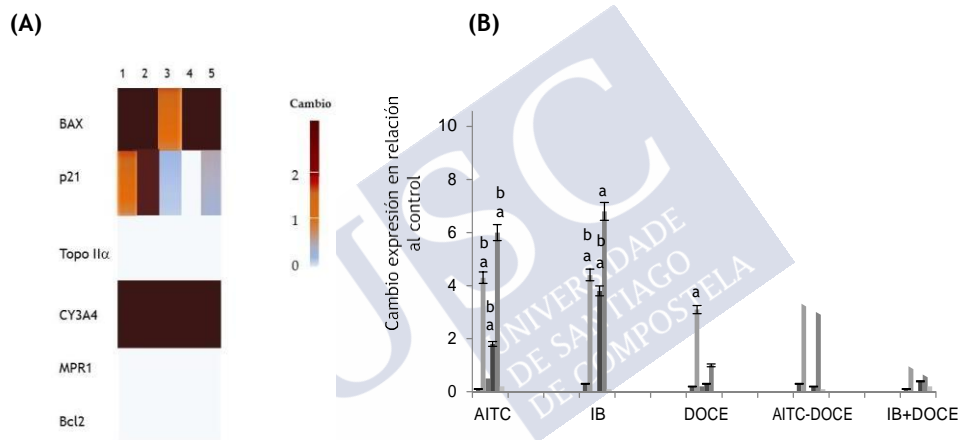


**Figura 26.** Efecto del SFN, DOCE o de la terapia combinada de DOCE+SFN sobre la expresión génica ( $2 - \Delta\Delta C_t$ ) de BAX, p21, MRP1, CYP3A4, Topo II $\alpha$  en células MCF7. Los datos se muestran como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Los valores superiores a uno se consideraron positivos en comparación con las células control. (A) 1, SFN con respecto al control; 2, SFN con respecto a DOCE; 3, SFN+DOCE con respecto a DOCE. (B) a, SFN significativamente diferente en comparación con el control ( $p < 0,05$ ); b, SFN significativamente diferente en comparación con DOCE ( $p < 0,05$ ); SFN+DOCE significativamente diferente en comparación con DOCE. Abreviaturas: BAX, BCL-2-associated X protein; Bcl2, proteína de la familia del linfoma de células B 2; CYP3A4: Citocromo p3A4; MRP1, *Multidrug resistance-associated protein*; p21, (CDKN1A) *cyclin dependent kinase inhibitor 1A*; TopoII $\alpha$ , Topopolimersa II $\alpha$ .

## 5.6.2. CP

Dado que AITC e IB fueron los ITCs que ofrecieron mejores resultados como terapia antitumoral, concretamente en células PC3, los estudios adicionales se centraron en esta línea celular altamente metastásica (Figura 27).

Verificamos mediante RT-q PCR los mecanismos moleculares que podrían estar implicados en los efectos antitumorales de AITC e IB (Figura 27).



**Figura 27. Efecto del SFN, DOCE o de la terapia combinada de DOCE+SFN sobre la expresión génica (2 - ΔΔCt) de BAX, p21, MRP1, CYP3A4, Topo IIα en células PC3.** Los datos se muestran como la media ± DE de tres experimentos independientes. Los valores superiores a uno se consideraron positivos en comparación con las células control. (A) 1, ITCs con respecto al control; 2, ITCs con respecto a DOCE; 3, ITC+DOCE con respecto a DOCE. (B) a, ITCs significativamente diferente en comparación con el control (p < 0,05); b, ITCs significativamente diferente en comparación con DOCE (p < 0,05); ITC+DOCE significativamente diferente en comparación con DOCE. Abreviaturas: BAX, BCL-2-associated X protein; Bcl2, proteína de la familia del linfoma de células B 2; CYP3A4: Citocromo p3A4; MRP1, Multidrug resistance-associated protein; p21, (CDKN1A) cyclin dependent kinase inhibitor 1A; TopoIIα, Topipolimersa IIα.

Las células tratadas con AITC, IB, DOCE, DOCE-AITC y DOCE-IB no mostraron una inducción significativa ( $p > 0,05$ ) de MRP1 o Topo II $\alpha$  en relación con el control o DOCE.

Por el contrario, todos los tratamientos aumentaron significativamente la expresión de CYP3A4 ( $p < 0,05$ ) así como la expresión de BAX con incremento en la relación BAX/Bcl-2 ( $p < 0,05$ ) en células PC3.

En relación con la p21, su expresión solo se modificó significativamente ( $p < 0,05$ ) en comparación con las células de control y las células tratadas con DOCE por los ITC, AITC e IB.



## 6. DISCUSIÓN

Según la *American Institute for Cancer Research* (AICR) y el WCRF, un tercio de los tumores pueden atribuirse a la nutrición (Choudhuri et al., 2011), lo que significa que una cantidad significativa de casos de tumores se podrían prevenir mediante la adopción de una dieta saludable (Caramia et al., 2007).

Los estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que una dieta adecuada y un estilo de vida saludable pueden reducir el riesgo de cáncer hasta en un 70%. Los cánceres más estrechamente relacionados con la nutrición son los CM y de endometrio en las mujeres y los CM y gastrointestinal en los hombres (Roomi et al., 2018).

Diferentes estudios muestran menor riesgo de cáncer en la población que consume crucíferas. Sirvan como ejemplo: (a) Menor riesgo de cáncer de pulmón, con asociación inversa entre la ingesta total de crucíferas y el riesgo de cáncer de pulmón en personas con genotipos nulos dobles GSTM1 y GSTT1. Estos genes pertenecen a la superfamilia de genes de fase II y codifican una variedad de isoenzimas de la glutatión S-transferasa (GST) que desempeñan un papel importante en el metabolismo xenobiótico (Lam et al., 2009); (b) menor riesgo de cáncer de colon (Tse et al., 2014); (c) relación inversa entre el consumo de brásicas y riesgo de CM (Lin et al., 2017); (d) disminución significativa del riesgo de CM en mujeres que tienen mayor ingesta total de frutas y verduras, especialmente de crucíferas [estudio del riesgo de CM invasivo entre 182.145 mujeres con una edad inicial entre 27 y 59 *Nurses' Health Study* (NHS, 1980-2012) y NHSII (1991-2013)]



realizado por Flavio et al., 2019]; (e) progresión del CP localizado (Traka et al., 2019).

Los compuestos bioactivos de la dieta en coexposición con fármacos empleados en la terapia del cáncer pueden tener un efecto sinérgico (Vu et al., 2015; Zou et al., 2020). Este aspecto conjuntamente con nuestros hallazgos podrían demostrar la importancia de una dieta específica durante la quimioterapia como tratamiento para el CM o el CP. El efecto combinado de los compuestos bioactivos de la dieta y algunos fármacos empleados en el cáncer seleccionados durante la quimioterapia pueden permitir dosis más bajas de estos, lo que podría reducir sus efectos adversos. Además, algunos compuestos bioactivos de la dieta constituyen el punto de partida para la síntesis de moléculas anticancerígenas nuevas y más potentes con efectos secundarios menores.

Los primeros esfuerzos de investigación en la búsqueda de terapia contra el cáncer a partir de productos naturales se centran principalmente en los compuestos con capacidad de citotoxicidad. Algunos ejemplos son la vinblastina, la vincristina, los derivados de camptotecina, el topotecan, el irinotecan, los derivados de epipodofilotoxina y paclitaxel. En última década, se ha avanzado fundamentalmente en la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares relacionados con la iniciación tumoral, metástasis, resistencia terapéutica, escape inmunológico y recaída, lo que brinda una gran oportunidad para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos basados en mecanismos. especialmente fármacos contra nuevos objetivos moleculares y celulares (Hua et al., 2017).

En esta memoria de tesis doctoral se han mostrado los resultados derivados del estudio *in vitro* de los ITCs mayoritarios en los cultivos de brásicas que representan a las tres clases de GSL: SFN, AITC, 4PI e IB (ITC derivados de los GSL alifáticos), I3C (indol derivado de un GSL indólico) y PEITC (ITC derivado de un GSL aromático).

Los resultados obtenidos muestran que algunos de los ITCs estudiados presentan efecto sinérgico de la citotoxicidad inducida por DOCE en líneas celulares de CM y CP, sin mostrar efecto citotóxico sobre células epiteliales sanas de mama y de próstata. Estos hallazgos podrían ser de utilidad en la terapia frente al CM y al CP.

En la práctica clínica, la expresión de los receptores hormonales determina la respuesta al tratamiento, el pronóstico y la supervivencia. A modo de ejemplo, según las directrices de la ASCO (2021) y de la *European Society of Medical Oncology* [(ESMO), 2020] el análisis de las características de los receptores hormonales constituye un estándar en CM y CP para tomar decisiones terapéuticas. El patrón de expresión de los receptores determina el tratamiento que incluye tratamiento hormonal, quimioterapia, anticuerpos o combinación de estos, a parte de la conveniencia o no de radioterapia. El CM y el CP que expresan ER (ER +), PR (PR +), AR (AR +) crecen en respuesta a la presencia de estrógenos, progesterona y andrógenos y responden mejor a la ablación endocrina.

En el presente estudio hemos utilizado líneas celulares CM y CP que reflejan la diversidad genómica, así como el tipo de tumor y la agresividad (Jian et al., 2016; Jividen et al., 2018) del CM y del CP. Se considera que las células de CM utilizadas en este trabajo poseen similitud con los tumores CM, tanto en el PAM50 (análisis de predicción de microarrays) como en el perfil de expresión génica completa (Jian et al., 2016). Las líneas celulares DU145 y PC3 son de CP metastático resistente a la castración (CPRCm). El CPRC implica que las células cancerosas se vuelven resistentes al tratamiento y dejan de responder a la terapia de privación de andrógenos. La terapia de privación de andrógenos tiene como objetivo bloquear el efecto de los andrógenos en CPRC, ya que tienen un efecto proliferativo. En la práctica clínica, entre el 10% y el 50% de los CP progresa a CPRCm dentro de los 3 años posteriores al diagnóstico y, a pesar de los avances en el tratamiento, sigue siendo letal. Cuando se produce CPRC, se

requieren nuevos tratamientos para reducir la señal androgénica y, en consecuencia, el crecimiento tumoral, aunque también suele desarrollarse resistencia [*PROXIMA Prospective Registry* (Akaza et al., 2018)]

En este trabajo de tesis doctoral se ha constatado que los efectos de los compuestos ensayados pueden estar condicionados por el tipo celular. A continuación se argumentan los mecanismos que pueden estar implicados en la respuesta celular al tratamiento. Este aspecto, podría tener especial importancia en la práctica clínica teniendo en cuenta la variabilidad de los tipos de CM y CP y la similitud de las líneas celulares empleadas en este estudio con dichos tipos de cáncer (detallados en el apartado de Introducción).

A continuación analizaremos los resultados derivados de cada uno de los objetivos específicos formulados en este trabajo, contrastándolos con los estudios de otros autores.

## **6.1. INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA**

En los ensayos realizados se ha constatado que existe una respuesta al tratamiento con ITCs o de ITCs+DOCE que es célula dependiente. Se sabe que las células MCF7 y las células T47D, ambas son células RE +, RP + RA +, pero las células MCF7 difieren de las células T47D en que expresan continuamente RE mientras que las células T47D pierden expresión de RE y RP cuando se suprimen los estrógenos (Sweeney et al., 2012) y también en los niveles de expresión de ER y PR (Mota et al., 2017). Además, la actividad RA es necesaria para el crecimiento de las líneas celulares RE + / RA + MCF7 y T47D (D'Amato et al., 2016). Tanto MCF7 como T47D expresan RA pero dos vías reguladoras diferentes pueden estar implicadas en la estimulación de la proliferación inducida por andrógenos; resultando en diferente repercusión sobre la actividad proliferativa. Las células MCF7 muestran mecanismos de MCF7 mediados por RA e independientes de RA, mientras que T47D exhibe solo uno que es mediado por RA. Además, las células

MCF7 expresan un RA de tipo salvaje caracterizado por una repetición CAG acortada, mientras que T47D presenta una longitud de repetición CAG considerada en el rango normal (Magklar et al., 2002). Este acortamiento representa un receptor más activo (Chamberlain et al., 1994). Además, estas líneas celulares difieren en RA-FL (RA de longitud completa) y variantes de corte y empalme de la expresión del gen RA (ARV). Estos últimos son isoformas anormalmente truncadas de la proteína RA que en su mayoría han demostrado ser factores de transcripción independientes de andrógenos constitutivamente activos que están implicados en la resistencia al tratamiento en CP y en CM. Los ARV varían ampliamente entre las líneas celulares CM y CP probadas. Como ejemplo, las células MDA-MB-231 exhiben la proporción más alta de ARV en relación a AR-FL, seguidas de las células T47D y MCF7. Además, las células MDA-MB-231 exhiben una expresión de AR-FL baja y una expresión de AR-V3 más alta. Existen variantes de empalme AR45, AR-V1, AR-V7 y AR-V9 que poseen las células T47D y MCF7 (Hu et al., 2014). Por otro lado, las células DU145 y PC3 no expresan RA y RE $\beta$ , mientras que las PC3 expresan RE $\alpha$  (Lafront et al., 2020).

En este estudio hemos observado que los compuestos ensayados tienen efecto célula específica. En particular las células MCF7 mostraron mayor sensibilidad al SFN que otras líneas celulares tanto ER+PR+ como las T47D o las ER-, PR- como las MDA-MB-231.

En cuanto a las líneas de células CP utilizadas en el presente estudio, PC3 y DU145 se diferencian en la expresión de las isoformas RP (PR-A y PR-B). Mientras que PC3 presenta los dos promotores metilados e inactivados, DU145 los presenta no metilados y activados. Cabe señalar que dos promotores controlan la expresión de las isoformas RP y que la hipermetilación de áreas ricas en citosina en los promotores se considera una inactivación funcional (Sasaki et al., 2002). La sobreexpresión de RP (isoforma A) está implicada en la actividad de la ciclina D1; aumenta los promotores proliferativos (TGF $\beta$ 1) así como los cambios pro-

invasivos y promigratorios (rotura de la membrana basal, etc.). Curiosamente, esos efectos pueden contrarrestarse con antiestrógenos (Sampayo et al.,2013).

Si consideramos el tipo de ITC, sus efectos antiproliferativos pueden ser atribuidos a diferentes aspectos, atendiendo a estudios de otros autores y a los expuestos en esta tesis doctoral. Veamos algunos aspectos de interés al respecto en relación con cada compuesto.

#### SFN:

- Al SFN se le atribuyen diferentes mecanismos como: (a) la disminución de los niveles de proteína de ciclina D1, ciclina E, Cdk4 y Cdk6 (células LNCaP) (Herman-Antosiewicz et al., 2007); (b) la fosforilación de Cdc25C (gen que codifica la fosfatasa 3 inductora de fase M) mediada por la quinasa 2 del punto de control, lo que induciría su secuestro en el citoplasma (células DU145) (Singh et al., 2004); (c) la activación de la cinasa N-terminal de c-Jun en células DU 145 (Singh et al. 2004; Cho, et al.,2005) o (d) la inducción de p21 (células PC3 y LNCaP independientemente de la p53) (Clarke et al.,2008).
- En esta tesis doctoral hemos comprobado que el SFN aumenta la expresión de p21 (duplica) en relación al control y al DOCE (casi cuatricula) en células MCF7. En células PC3 el AITC y la IB incrementaban la expresión de p21 en relación al control; duplicando este en el caso de la IB aunque no modificaban dicha expresión en relación al DOCE.

- La progresión de la fase G2-M está regulada por las quinasas CDK1 que se activan en asociación con la ciclina A o la ciclina B. La ciclina-dependiente de quinasas inhibidor 1 (p21/WAF1) es uno de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina que inhiben los complejos ciclina/ CDK en la fase G 2/ M. Se ha encontrado que el p21/WAF1 está asociado con la detención del crecimiento celular (Li et al., 2014; Shamloo & Usluer, 2019).
- Los resultados mostrados en esta memoria muestran que p21 aumentó con el tratamiento con SFN, AITC e IB en relación al control (en células de CM y de CP) y con respecto al DOCE en células de CM (MCF7).
- Estudios de otros autores han constatado que SFN a 20  $\mu$ M induce p53 (Myzak et al. 2006a) y p21 en células de CP AI. En particular en células LNCaP (Myzak et al. 2006b; Herman-Antosiewicz et al.,2007), pero la inducción de p21 parece ser independiente de p53, ya que ocurre en ausencia de inducción de p53 y de la fosforilación de Ser15, y probablemente esté asociado con la inhibición de la actividad de HDAC. Además, SFN induce la detención de la fase S en las células LNCaP probablemente por la inducción de la ciclina B1 y la regulación a la baja de Cdk1 y Cdc25C. (Herman-Antosiewicz et al.,2007).

#### AITC:

- En relación con el AITC, otros autores han constatado que a una concentración de 20  $\mu$ M inducía la detención de la fase G2/ M tanto en células CP dependientes de andrógenos (LNCaP) como independientes (PC3), pero no en la línea

celular epitelial de próstata normal (PrEC). Este efecto, en ambas líneas celulares CP, se atribuía a una disminución de la expresión de las proteínas implicadas en la progresión G2/M: Cdk1, Cdc25B y Cdc25C, participando también la proteína ciclina B1 en las células LNCaP. (Xiao et al., 2003).

- En esta tesis doctoral hemos observado, que en células AD como las PC3 el AITC incrementaba la expresión de p21 con respecto al control.

#### PEITC:

- Con respecto a PEITC se considera que puede detener la transición de la fase G2/M en células de CP (Wang et al. 2008; Xiao et al., 2004; Hwang & Lee 2010; Tang et al., 2011) ya sea disminuyendo la expresión de la proteína Cdk1 y ciclina B1 (células LNCaP), aumentando la expresión de p53 y WEE1 (proteína-quinasa) e inhibiendo la proteína Cdc25C (células DU145) (Tang et al. 2011) o bien disminuyendo c-Myc en PC3; aliviando el efecto supresor sobre el promotor p21 (Wang et al., 2008).
- En los ensayos de esta tesis doctoral hemos verificado que el PEITC disminuía la actividad proliferativa con respecto al control en células de CM y de CP. Además incrementaba la actividad citotóxica sobre dichas células tratadas con PEITC o con PEITC con DOCE con respecto al DOCE.
- En estudios de otros autores solo se analizaba el efecto del PEITC (sin la comparación con quimioterápico de referencia) en células de CP y de su metabolito el conjugado de N-acetilcisteína de isotiocianato de fenetilo (PEITC-NAC), que se

produce como resultado del metabolismo en humanos por conjugación con glutatión seguida de la conversión a través de la vía del ácido mercaptúrico en un conjugado de NAC (Hwang and Lee, 2010).

Nuestros hallazgos *in vitro* son de interés en el tratamiento del CM y CP ya que: (1) Son compatibles con estudios en humanos en los que se ha constatado que la ingesta total de vegetales crucíferos se asocia con una disminución de la proliferación celular en el tejido del carcinoma ductal *in situ* (Zhang et al., 2016) y en la progresión de CP localizado (Traka et al., 2019); (2) algunos de los ITCs ensayados en los estudios incluídos en esta tesis doctoral presentan mayor actividad antitumoral que el DOCE.

Por otra parte podría planterse la utilidad en la práctica clínica de la asociación de DOCE con ITCs si tenemos en cuenta tres aspectos: (1) La terapia combinada de DOCE con otros fármacos es habitual en el CM [Baselga et al., 2012; Sociedad Española de Oncología Quirúrgica (SEOQ), 2013; Sharma et al., 2018; Desmedt et al., 2020; Brenner et al., 2021]; (2) en esta tesis doctoral hemos constatado el efecto sinérgico de algunos de los ITs con DOCE; (3) lo indicado en (2) podría contribuir a reducir los efectos adversos de DOCE.

## **6.2. EFECTO SENSIBILIZANTE DE ITCs FRENTE AL DOCE**

No existe un buen tratamiento para el CP cuando las células pierden la capacidad de respuesta a la supresión androgénica. (Dong et al. 2019). DOCE es una alternativa terapéutica pero con importantes efectos secundarios y limitada respuesta anticancerígena, entre otros aspectos por la aparición de



resistencias (Novio et al.,2014; Tonyali et al. 2017). Estas desventajas podrían abordarse mediante terapias combinadas.

En el presente estudio, observamos que los ITCs tienen una eficacia anticancerosa muy prometedora en células prostáticas metastásicas, lo que podría ser clínicamente relevante y de potencial uso en el futuro como terapia coadyuvante en pacientes que presentan la resistencia a la castración.

Más interesante que el efecto anticanceroso *per se* de los ITCs fue la capacidad para potenciar la acción de DOCE constatada en este estudio. Como se ha comentado previamente, encontramos que la combinación de DOCE con SFN, AITC, PEITC o IB indujo una sensibilización sinérgica de PC3 y DU145 a la inhibición del crecimiento celular inducida por DOCE. Así mismo, el SFN y el AITC produjeron una sensibilización sinérgica frente al DOCE en células MCF7 y T47D de CM. El efecto sinérgico que observamos podría deberse a diferentes aspectos, que comentamos a continuación y se recogen en la Figura 28:

- Los agentes dirigidos a microtúbulos (MTA) como DOCE son un tratamiento eficaz para tumores sólidos como el CM y el CP. Este fármaco es el tratamiento estándar para dichos cánceres, tanto metastásicos como resistentes a otros tratamientos (Negri-Cesi et al., 1999; Wiebe et al., 2003; Aka et al., 2012; Akaza et al., 2020; Farha et al., 2020).
- Un gran número de agentes de origen natural dirigidos a los microtúbulos son antimitóticos al actuar sobre la proteína tubulina y los microtúbulos [(Lumachi et al., 2015; *CHAARTED Trial* (Kyriakopoulos et al., 2018)]. Estos fármacos pueden clasificarse según su efecto en agentes desestabilizadores de microtúbulos (alcaloides de la vinca, criptoficinas, etc.) y agentes estabilizadores de microtúbulos (MTSA) que incluyen al paclitaxel

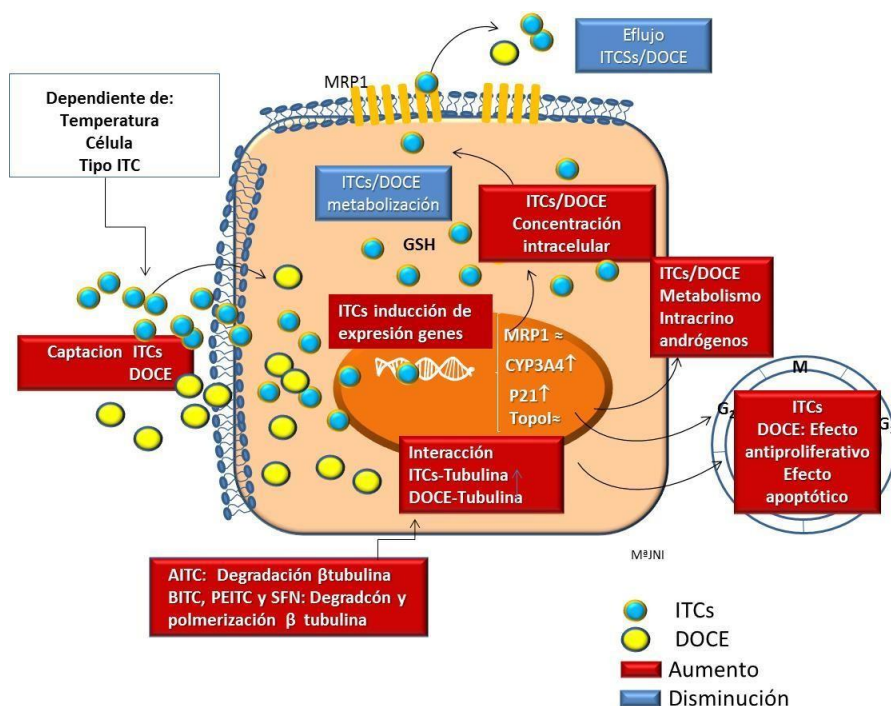
y su análogo semisintético DOCE (Kyriakopoulos et al., 2018), el quimioterápico probado en los ensayos que se incluyen en esta tesis doctoral.

- Los microtúbulos constituyen una diana terapéutica en común para ITCs y DOCE. DOCE se une a las subunidades de la  $\beta$ -tubulina de los microtúbulos en el lado de unión a los taxanos, induciendo la supresión de la dinámica de los microtúbulos (dosis bajas) o la estabilización de los microtúbulos (Kyriakopoulos et al., 2018). DOCE, se une a estos y provoca no solo su estabilización sino también la inhibición de su despolimerización, lo que ejerce efectos antiproliferativos y proapoptóticos, respectivamente (Stanton et al., 2011). Algunos autores afirman que los efectos antiproliferativos y proapoptóticos de los ITCs se deben a la degradación y polimerización de la tubulina  $\alpha$  y  $\beta$  (Mi et al., 2009).
- Una mayor acumulación intracelular de DOCE y/o ITCs puede condicionar su efecto sensibilizante, ya que su eficacia depende de su acumulación intracelular que a su vez está determinada por el equilibrio entre los procesos de captación y salida. En este sentido, y teniendo en cuenta que los ITCs pueden inhibir la exportación celular de agentes anticancerosos (Tseng et al., 2002), en esta tesis doctoral se estudió la expresión del transportador de eflujo unidireccional MRP1, que juega un papel en el desarrollo de la farmacorresistencia de varios tipos de cáncer (Cole, 2014). Sin embargo, la expresión de MRP1 no fue modificada por los tratamientos probados en el presente estudio.

- Modulación del metabolismo intracrino de andrógenos mediada por CYP3A4. El CYP3A4 aumenta la biodisponibilidad de los andrógenos promotores del crecimiento en las células CP (Maguire et al., 2012), por lo que tiene especial relevancia en la práctica clínica. Los niveles bajos de expresión de CYP3A4 se han asociado con un mal pronóstico en pacientes con CP, como metástasis, puntuación de Gleason alta y supervivencia reducida (Fujimura et al., 2009). Este mecanismo no pudo explicar los efectos antiproliferativos, proapoptóticos y antimigratorios de AITC o IB en las células PC3 que se muestran en los ensayos realizados en esta tesis doctoral, ya que usamos células de CP insensibles a andrógenos. Sin embargo, la esteroidogénesis intratumoral podría afectar al tejido circundante e influir indirectamente en el comportamiento de las células tumorales (Jernberg et al., 2017). Concretamente, se ha demostrado que los esteroides sintetizados *de novo* por las células cancerosas juegan un papel importante en el establecimiento de metástasis y la inducción de la resistencia a la castración en las células PC, al afectar a las células positivas al receptor de andrógenos en el microambiente tumoral. Esto es, en los fibroblastos del estroma, células de músculo liso, células endoteliales, osteoblastos y células inflamatorias.
- El nivel/actividad intracelular del glutatión (GSH). La captación de células ITCs y la acumulación intracelular están condicionadas por los niveles / actividad intracelular de GSH, ya que su captación se produce a través de la unión con grupos cisteína sulfhidrilo de GSH. Teniendo en cuenta que los altos niveles/actividad de GSH favorecen la absorción de

ITCs (Zhang, 2012), el mayor efecto citotóxico de SFN y su efecto sinérgico con el DOCE en las células PC3 que en las células DU 145 mostrado en el presente estudio, podría explicarse por los niveles más altos de GSH observado por otros autores en PC3 en comparación con células DU 145 (Jayakumar et al., 2014).

- Si bien son muy escasos los estudios de terapia combinada con quimioterápicos e ITCs, otros autores atribuyen un efecto sinérgico de PEITC con el taxol a un mecanismo epigenético. El taxol actúa a través de la inhibición del desmontaje de microtúbulos cuando se une a la tubulina ensamblada, bloqueando microtúbulos en estado polimerizado. El PEITC induciría la hiperacetilación de alfa-tubulina en dos líneas celulares de CM MDA-MB-231 y MCF7 potenciando los efectos del taxol en este a nivel de la tubulina (Liu et al., 2013; Cang et al., 2014).
- Entre los escasos estudios existentes en la literatura sobre el tratamiento combinado de ITCs y quimioterápicos, Hussain et al. (2013) constataron que el SFN combinado con gemcitabina tenía efecto sinérgico sobre la citotoxicidad de dicho quimioterápico en células de CM MCF7. Según otros autores (Zang et al. 2020) el PEITC tenía efectos sinérgicos con el gefitinib (sobre el inhibidor de tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico) en líneas celulares de cáncer de pulmón (NSCLC NCI-H1299 y SK-MES-1).



**Figura 28. Mecanismos potenciales para explicar el efecto sinérgico de la combinación de ITCs y DOCE en células de CP y de CM.** Interacción de ITCs y DOCE con los microtúbulos; Captación, acumulación y salida de ITCs y DOCE mediada por la expresión de transportadores de salida y/o niveles /actividad de glutatión (GSH); Modulación del metabolismo intracrino de andrógenos. La expresión de los genes observados en este estudio (indicados como ≈ modificación no sustancial y ↑ aumento), produce inhibición de la actividad proliferativa y apoptosis. Abreviaturas: ITC, isotiocianato; DOCE, docetaxel; MRP1, proteína 1 asociada a la resistencia a múltiples fármacos; p21, inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1; Topo II, ADN topoisomerasa 2-alfa. Fuente: Adaptado de Núñez et al., 2019.

### **6.3.EFECTO APOPTOTICO**

Como ya se ha comentado previamente, el DOCE y el paclitaxel son taxanos que se utilizan ampliamente en la clínica para el tratamiento de cánceres de ovario, mama, pulmón y otros tumores sólidos. Comparten un mecanismo de acción común al promover y estabilizar el ensamblaje de microtúbulos, lo que altera la dinámica de los microtúbulos y activa crónicamente el punto de control del ensamblaje del huso (SAC), induciendo así una detención mitótica prolongada que finalmente conduce a la muerte celular. La salida mitótica prematura, también conocida como deslizamiento mitótico, generalmente debido a un SAC defectuoso, se considera un proceso a través del cual las células tumorales evaden la muerte por los taxanos y desarrollan resistencia a los fármacos. Aunque se conoce que las funciones no mitóticas de los taxanos y el paclitaxel causa muerte celular en interfase, las señales proapoptóticas se acumulan con frecuencia durante la detención mitótica prolongada. Además, las proteínas antiapoptóticas a menudo disminuyen o pierden sus funciones de pro-supervivencia durante la detención mitótica, lo que indica una relación causal entre la detención mitótica y la apoptosis. Se ha demostrado que el direccionamiento de la salida mitótica o de las proteínas antiapoptóticas potencia la actividad anticancerígena de los taxanos (Han et al., 2021).

El grupo de investigación en el que se enmarca la realización de esta tesis doctoral está analizando, como parte del proyecto de investigación que financia los ensayos realizados en esta tesis doctoral y otros no incluidos en la misma, los efectos de ITCs sobre la expresión génica de proteínas inhibidoras de la apoptosis entre las que se encuentra la survivina. Nuestros resultados preliminares, todavía no publicados, apuntan a un efecto reductor. Por otra parte, en una publicación incluida en esta tesis doctoral (Núñez et al., 2019), tal y como se aprecia en los

resultados anteriormente recogidos en esta memoria, mediante RT-q PCR hemos constatado que los ITCs pueden modificar la expresión de genes relacionados con el ciclo celular/apoptosis (p21, BAX y Bcl2).

En esta tesis doctoral hemos verificado que el SFN en células MCF7 aumentaba la expresión de BAX y disminuía la expresión de Bcl2 en relación al control y al DOCE. Así mismo, aumentaba y disminuía BAX y Bcl2, respectivamente, tras el tratamiento con DOCE en comparación con SFN+DOCE. En células PC3 hemos encontrado que el AITC y la IB aumentan el BAX en respecto al control y al DOCE. Cabe destacar que casi se multiplica por 9 la expresión de BAX tras los tratamientos con AITC e IB en comparación con DOCE.

Ambos hallazgos podrían ser de especial interés en la práctica clínica dada la potenciación de la actividad apoptótica del DOCE observada en la terapia combinada con ITCs.

Estudios de otros autores en los que solo se verificaba el efecto de ITCs, sin el estudio del efecto de fármacos quimioterápicos, se constató que algunos ITCs podían inducir apoptosis a través de diferentes vías en función de las características de las células tumorales. El SFN podía activar las caspasas para desencadenar la apoptosis tanto en la DU 145 como en la PC3 (Singh et al., 2004). En células de CP AI como LNCaP el SFN podría inducir la activación de Bax a las dosis de 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M y 40  $\mu$ M y en las células PC3 a 40  $\mu$ M, mostrando, por tanto, una mayor sensibilidad a la apoptosis las células LNCaP. No obstante cabe reseñar a la dosis más elevada usada por dichos autores existiría citotoxicidad sobre las células sanas, de acuerdo con nuestros estudios para establecer la dosis de ITCs a ensayar que no presentase dichos efectos.

Singh et al. (2004) atribuían la discrepancia en la sensibilidad celular a la diferencia en el perfil de activación de BAX o la capacidad de respuesta a los andrógenos entre estas líneas celulares. La disminución de P53 en las células LNCaP no confiere protección contra la apoptosis inducida por SFN. Por tanto, parece que la diferencia en el estado de p53 entre estas células no contribuía a la diferencia en la sensibilidad a la muerte celular programada (Choi et al., 2007).

Otros estudios en los que solo se analizaba el efecto de ITCs, sin establecer comparación con algún quimioterápico, han constado que el PEITC estimulaba la producción de ROS (Tang et al., 2011; Xiao et al., 2010), provocando así la activación de la proteína proapoptótica Bax en las células LNCaP y PC3 (Xiao et al., 2010). Además, aumentaba la liberación por parte de la mitocondria del citocromo C. (Tang et al. 2011). Por otra parte, también actuaba en la vía extrínseca, aumentando la actividad de las caspasas 3, 8 y 9 en las células DU145 (Tang et al., 2011) y las caspasas 8 y 9 a una concentración de 10  $\mu$ M en las células PC3 (Xiao et al., 2004).

Cabe reseñar que la dosis de 10  $\mu$ M usada por dichos autores en las células PC3 tendría efectos citotóxicos sobre células sanas de próstata, según hemos comprobado en este trabajo de tesis doctoral.

Por otra parte según los citados autores PEITC regulaba negativamente tanto la XIAP como la survivina en células PC3 y LNCaP, siendo más sensibles a la apoptosis inducida por PEITC las células LNCaP en comparación con las PC3 (2,5–5  $\mu$ M). Por el contrario, una sobreexpresión de survivina protegería a estas células del efecto proapoptótico de PEITC (Sakao et al., 2012).



Otros ITCs como el BITC actuarían en las células DU145 promoviendo la apoptosis a través de la vía intrínseca, aumentando la producción de ROS (12 h después del tratamiento) seguida de aumento de  $\text{Ca}^{2+}$ , con descenso de los potenciales de la membrana mitocondrial y liberación del citocromo C e incremento de la actividad de las caspasas 3, 8 y 9 (Liu et al., 2011).

#### **6.4. ACTIVIDAD CITOPÁTICA**

Los resultados que conforman esta tesis doctoral incluyen la actividad citopática valorada mediante microscopía confocal. Los resultados correspondientes a la actividad citopática en células de CP han sido publicados tal y como se recoge en el artículo que se anexa a esta memoria.

Son escasos los estudios existentes en la bibliografía sobre el tratamiento combinado de ITCs con quimioterápicos en los que se analice esta actividad. El estudio de Hussain et al. (2013) refleja el efecto citotóxico de SFN en combinación con gemcitabina constatado, entre otros aspectos, por cambios en la morfología celular de células MCF7; si bien eran observados mediante microscopía invertida. En el estudio de Raudenska et al. (2019) en los que únicamente se analizaba el efecto *in vitro* de cisplatino y DOCE sobre células PC3 muestran que dichos tratamientos modifican la EMT con cambios en la morfología. En nuestro estudio se constatan cambios compatibles con citotoxicidad mediante microscopía confocal.

## 6.5.ACTIVIDAD ANTIMIGRATORIA

En los ensayos de migración hemos constatado que los ITCs ensayados reducen de forma significativa la migración de células de CM y de CP. Por otra parte, mediante microscopía confocal hemos observado cambios en la morfología celular desde una forma elongada a una elipsoide o redondeada.

Paralelamente hemos constatado, mediante RT-qPCR que los tratamientos con SFN o con SFN+DOCE aumentaban la expresión de p21 y de Bax en células MCF7 y que los tratamientos con AITC e IB o con AITC+DOCE o IB+DOCE incrementaban la expresión de p21 en células PC3 en relación al control o al DOCE.

En nuestro estudio la disminución de la actividad migratoria mediante transwell o el cambio en la morfología celular podría ser atribuida, al menos en parte, al incremento en la expresión de p21 y de Bax ocasionado por el tratamiento con los ITCs solos o en combinación con DOCE.

Los efectos antimigratorios de los ITCs o de ITC+DOCE que hemos observado podrían ser explicados por los siguientes aspectos:

- p21 es un efector descendente de varios supresores de tumores, incluido p53 (el-Deiry et al.,1993; Waldman et al., 1995; Deng et al., 1999; Genecards 2021; Gene NCBI 2021).
- Además de su papel en el control del ciclo celular, la pérdida de p21 induce EMT, un efecto parcialmente mediado por la regulación a la baja de la familia miR-200 y el grupo miR-183 a través de la activación de ZEB1 (Li et al., 2014).

- En células deficientes en p21 se produce EMT, aumento de la actividad migratoria y metastática. Contrariamente al aumentar la expresión de p21 disminuye la migración y la invasión de las células cancerígenas (Li et al., 2014).
- La EMT incluye cambios en la morfología celular de modo que las células cancerígenas se elongan y se modifica la distribución de la actina (Hýžd'álová et al., 2021).
- Estudios *in vitro* con cisplatino y DOCE en células PC3 muestran que dichos tratamientos modifican la EMT con cambios en la morfología acompañados con incremento en la resistencia al movimiento y disminución de la migración (Raudenska et al., 2019).
- Un estudio (Peng et al., 2015) constató que el SFN (15  $\mu$ M) inhibía la migración y la invasión cambiando la morfología de las células DU145.
- Bax facilita la transición mesenquimo-epitelial (TME) de células cancerígenas mediante dos mecanismos: Inhibiendo las proteínas Bcl2 prosupervivencia y actuando sobre el complejo respiratorio celular-I, lo que disminuiría la actividad migratoria (Kim et al., 2018). En nuestro estudio hemos constatado su aumento mediante RT-qPCR.

## **6.6. MECANISMOS DE ACCIÓN QUE JUSTIFIQUEN POSIBLES EFECTOS ITCs SOBRE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA, APOPTÓTICA Y ANTIMIGRATORIA DE ESTAS CÉLULAS TUMORALES ASÍ COMO LA SENSIBILIZACIÓN A LOS EFECTOS DEL DOCE Y LA EXPRESIÓN DEL FENOTIPO CELULAR**

Varios ITCs han demostrado ser agentes terapéuticos potenciales en el cáncer debido a sus efectos antiproliferativos (Xiao et al., 2013; Tang et al., 2011), proapoptóticos (Tang et al., 2011; Clarke et al., 2008) y antimigratorios (Hahm et al., 2012; Shankar et al., 2008). Aunque los mecanismos por los que producen los efectos anticancerígenos de los ITCs no se conocen completamente, su acción citotóxica suele estar asociada con la detención del ciclo celular y la activación de la apoptosis (Novio et al., 2016; Zhang, 2012).

Si bien en esta discusión ya se han abordado algunos aspectos relativos a los mecanismos de acción, en este apartado, atendiendo a los resultados derivados de RT-qPCR en este estudio, analizaremos sus posibles implicaciones sobre la eficacia terapéutica de los tratamientos con ITCs solos o en combinación con DOCE.

### **6.6.1. p21**

El cáncer se desarrolla debido a un desequilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular. Diversos estudios han propuesto diversos mecanismos de carcinogénesis, así como de nuevos agentes anticancerosos que podrían dirigirse al tratamiento del cáncer. Entre estos, p21 es reconocido como un potente inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina que facilita la detención del ciclo celular al interactuar con diferentes estímulos como p53, proceso de reparación del ADN, CDK, E2F1, MYC,

PCNA, STAT3 AP4, proteasomas, K1F, CDX2, y ER- $\alpha$ . p21 actúa como un gen supresor de tumores y un inhibidor de la apoptosis al interactuar con varias moléculas y factores de transición. Además actúa inhibiendo la EMT (Li et al. 2014; Parveen et al., 2016; Shamloo & Usluer, 2019; Genecards 2021; Gene NCBI 2021).

En este estudio hemos observado que en las células MCF7 tratadas con SFN solo o en combinación con DOCE aumentaban la expresión de p21 en comparación con DOCE solo. Así mismo, las células PC3 tratadas con AITC e IB mostraron aumento en la expresión de p21 y en la relación Bax/Bcl2. Este hallazgo concuerda con el efecto citotóxico, apoptótico y antimigratorio que hemos observado en este estudio.

Se considera que en el futuro, la actividad supresora tumoral de p21 debería ser el foco de estrategias de tratamiento novedosas, que puedan conducir al desarrollo de agentes anticancerígenos nuevos y selectivos para la terapia dirigida frente al cáncer (Parveen et al., 2016). Esto nos hace pensar que nuestros hallazgos podrían ser de interés en el tratamiento del CM y del CP.

### **6.6.2. BAX y Bcl2**

La familia de proteínas Bcl2 controla la muerte celular principalmente mediante interacciones de unión directa que regulan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), lo que conduce a la liberación irreversible de proteínas del espacio intermembrana, la posterior activación de caspasas y apoptosis. Las afinidades y la abundancia relativa de las proteínas de la familia Bcl2 dictan las interacciones predominantes entre las proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas que regulan la MOMP. La familia Bcl2 se divide en tres grupos según su función primaria: proteínas antiapoptóticas (Bcl2, Bcl-XL, BCL-W, MCL-1, BFL-1/A1); formadores de poros proapoptóticos (BAX, BAK, BOK) y proteínas proapoptóticas solo de BH3 (BAD, BID, BIK, BIM, BMF, HRK, NOXA, PUMA, etc.). Todas las proteínas de la

familia Bcl2 contienen un dominio BH3; uno de cuatro dominios BH implicados en las interacciones entre estas proteínas (Kale et al., 2018).

En esta tesis doctoral observamos que en células de CM MCF7 el tratamiento con SFN triplicaba la expresión de BAX respecto a control y al tratamiento con DOCE. Así mismo, la expresión de BAX se incrementó (1,5 veces) tras el tratamiento con SFN+DOCE en comparación con DOCE.

Paralelamente, hemos constatado que el tratamiento con SFN reducía la expresión de Bcl2 con respecto al control y al tratamiento con DOCE. Así mismo, el tratamiento con SFN+DOCE reducía la expresión de Bcl2 en relación al tratamiento con DOCE.

En células de CP PC3 hemos apreciado que AITC e IB, ya fuera en tratamiento solo o bien combinado con DOCE, incrementaban la expresión de BAX aunque no tenían efecto reseñable sobre Bcl2.

Cabe destacar que el tratamiento combinado de AITC+DOCE y de IB+DOCE en células PC3 casi cuadruplicaba la expresión de BAX en reacción al tratamiento con DOCE.

BAX, un regulador central de la muerte celular, es una puerta de entrada indispensable a la disfunción mitocondrial y un miembro proapoptótico importante de Bcl-2 que controlan la apoptosis en células normales y cancerosas. La disfunción de la apoptosis hace que la célula cancerosa sea resistente al tratamiento y promueve la tumorigénesis. La activación de Bax induce la permeabilización de la membrana mitocondrial, lo que conduce a la liberación del factor apoptótico citocromo C y, en consecuencia, a la muerte de las células cancerosas (Liu et al., 2016).

El incremento de BAX y la reducción de Bcl2 o bien el incremento de BAX que hemos observado en células MCF7 y PC3, respectivamente, explicaría la actividad citotóxica y apoptótica de dichos tratamientos; observada mediante los diferentes ensayos realizados en esta tesis doctoral.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que los puntos de control para la detención del ciclo celular y la muerte celular programada podrían estar regulados por los ITCs en las células de CM y de CP estudiadas.

Nuestros hallazgos pueden ser de interés para la práctica clínica si tenemos en cuenta que varios fármacos de uso clínico actualmente activan indirectamente a BAX y que estudios recientes demuestran que BAX puede servir como una diana terapéutica para el descubrimiento de fármacos para la terapia del cáncer con el potencial de superar la quimio y la radiorresistencia (Liu et al., 2016).

#### **6.6.3. CYP3A4**

Para conocer la repercusión de los hallagos encontrados en este estudio, aumento de la expresión de CY3A4 causada por ITCs solos o en terapia combinada con DOCE, en comparación con DOCE (SFN en células MCF7; AITC, PEITC e IB en células PC3) analizaremos cuál es la implicación de CY3A4 en el desarrollo del CM y del CP así como en la eficacia del tratamiento farmacológico de dichos cánceres.

Las enzimas CYP son responsables del metabolismo de fase I de los estrógenos y, por lo tanto, tienen un papel destacado en la patogénesis del CM. En tejidos extrahepáticos, CYP1B1 es responsable de la conversión de E2 en 4-hidroxiestradiol que puede actuar como carcinógeno, mientras que CYP1A1 y CYP3A4, por

otro lado, metabolizan E2 en su 2-hidroxi metabolito no carcinogénico (van Eijk et al., 2019).

Si tenemos en cuenta lo expuesto en el párrafo anterior los resultados encontrados en este trabajo serían beneficiosos en la práctica clínica.

Aunque la funcionalidad no hay datos concuyentes sobre los niveles de CYP3A4 en el tejido tumoral y está por dilucidar en relación con el metabolismo extrahepático de fármacos, es posible que el metabolismo intratumoral mediado por dicha enzima pueda tener implicaciones para el tratamiento con taxanos en algunos CM.

En la revisión de van Eijk et al. (2019) se muestra que el análisis de CYP3A4 en el tejido de CM o en tejido tumoral en comparación con el tejido circundante sano presenta resultados contradictorios (RT-PCR, IHC o western blot). Sirva como ejemplo que para la misma técnica, RT-PCR, se podría encontrar expresión elevada o inexistente de CYP3A4.

La inducción hepática de las enzimas CYP3A por el paclitaxel y, en menor grado, por el DOCE, suscita preguntas sobre si un mecanismo similar podría tener un efecto sobre la expresión las enzimas CYP3A en los tumores (Ikezoe et al. 2004; Nallani et al., 2004; Li et al., 2013).

Al igual que en la presente tesis doctoral, otros autores han constatado que en respuesta al tratamiento con DOCE aumenta la expresión CYP3A4 en células DU145 o MCF7 (Ikezoe et al., 2004; Nallani et al., 2004; Li et al., 2013) y en xenoinjertos de células DU145 en ratones desnudos BNX (Ikezoe et al., 2004). Este mecanismo puede tener relevancia clínica durante la aplicación de quimioterapia con taxanos, ya que puede afectar el resultado del tratamiento (van Eijk et al., 2019).



En relación con algunos fármacos como la ifosfamida, aunque es mínimo, el mecanismo de su metabolismo mediado por CYP3A4 está presente en los microsomas del CM (van Eijk et al., 2019).

Si bien en esta tesis doctoral se ha constatado que en células MCF7 el SFN no modifica la expresión de CYP3A4, en próximos estudios analizaremos el papel de CYP3A4 en el metabolismo de ITCs o de ITCs +DOCE en células de CM.

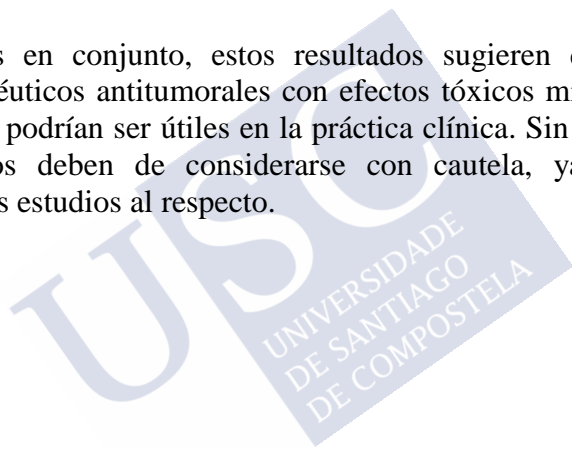
Con respecto al CP existe una asociación entre los polimorfismos y haplotipos de CYP3A4 y CYP3A5 y el riesgo y la agresividad de dicho cáncer. El CY3A4 está elevado en el CP en comparación con el tejido prostático sano. La puntuación de inmunorreactividad (suma de la proporción de células teñidas positivamente y la intensidad de la tinción) de CYP3A4 es más baja en el tejido de CP en comparación con el epitelio sano que rodea al tumor y presenta una correlación inversa significativa con una puntuación de Gleason más alta y un pronóstico más precario en los pacientes. La expresión de CYP3A4 está disminuída en las células CPCR en comparación con el tejido prostático benigno. Fisiológicamente, dicho aspecto podría explicarse por una conversión reducida de andrógenos, como la testosterona, en el metabolito inactivo 6 $\beta$ -hidroxitestosterona (6 $\beta$ -OH-T), lo que conduce a una mayor proliferación dependiente de andrógenos (van Eijk et al., 2019).

En este estudio hemos observado incremento en la expresión de CYP3A4 en células PC3 de CP tras el tratamiento con diferentes ITCs solos o en asociación con DOCE, en comparación con el DOCE. Si extrapolamos este hallazgo a la la práctica clínica podría ser de utilidad en el tratamiento del CP y en particular del CPCR ya que las células empleadas en este estudio son consideradas CPCRm.

Pese a la posible utilidad citada, nuestro hallazgo debe de manejarse con cautela y requiere ensayos posteriores ya que en el tejido prostático sano y en el umoral protático existe una expresión heterogénea de CYP3A4, CYP3A5 y CYP2C8, posiblemente contribuyendo a una respuesta variable al tratamiento con taxanos, aunque la expresión puede estar disminuida en tejido maligno en comparación con tejido sano (van Eijk et al., 2019).

En próximos estudios estudiaremos el papel de CYP3A4 en el metabolismo de ITCs o de ITCs +DOCE en células de CP.

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que estos efectos terapéuticos antitumorales con efectos tóxicos mínimos en células sanas podrían ser útiles en la práctica clínica. Sin embargo, los resultados deben de considerarse con cautela, ya que se requieren más estudios al respecto.



## 7. CONCLUSIONES

- 1) El efecto citotóxico del tratamiento con SFN, AITC o PEITC en las células de CM fue dependiente de las células ensayadas; mostrando mayor efecto en las ER+, PR+ (MCF7 y T47D) que en las células TN (MDA-MB-231).
- 2) El efecto citotóxico del tratamiento con SFN, AITC o PEITC en las células de CM fue mediado, al menos en parte, por mecanismos apoptóticos y de detención del ciclo celular.
- 3) El tratamiento con SFN presentó mayor efecto citotóxico que el tratamiento con el quimioterápico de referencia, el DOCE, en células de CM ER+ yPR+.
- 4) En células de CM TN el tratamiento con SFN presentó mayor efecto citotóxico que la menor dosis de DOCE pero únicamente a la dosis más elevada de SFN, tras 72 h de exposición.
- 5) En las tres líneas celulares de CM, el tratamiento con PEITC presentó mayor efecto citotóxico, que la menor dosis de DOCE, aunque únicamente cuando las dosis de PEITC eran las más elevadas.
- 6) El tratamiento con SFN o con AITC sensibilizó a los efectos citotóxicos del DOCE a las células de CM ER+ PR+, por mecanismos sinérgicos.
- 7) En células MCF7 el tratamiento con SFN solo o combinado con DOCE, en comparación con el tratamiento con DOCE, modificó la expresión de genes implicados en la regulación del

ciclo celular, la apoptosis y la EMT; aumentando la expresión de p21 y de BAX y disminuyendo la expresión de Bcl2.

- 8) El tratamiento con AITC, SFN, IB o PEITC produjo efecto citotóxico dependiente de la dosis y del tiempo en las células de CP PC3 y DU145 que fue mediado, al menos en parte, por mecanismos apoptóticos y de detención del ciclo celular.
- 9) El tratamiento con AITC, SFN, IB o PEITC sensibilizó a los efectos citotóxicos del DOCE a las células de CP PC-3 y DU 145, por mecanismos sinérgicos.
- 10) El tratamiento con AITC o IB solo o en combinación con DOCE, en comparación con el tratamiento con DOCE, aumentó la expresión de p21; gen implicado en la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la EMT.
- 11) En células de CP PC3 el tratamiento con AITC o IB, solo o en combinación con DOCE, aumento la expresión de CYP3A4 en comparación con el tratamiento con DOCE.
- 12) Los cambios en la expresión génica derivados del tratamiento con ITCs en combinación con DOCE pueden explicar, al menos en parte los efectos sensibilizantes frente al DOCE.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: Intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 400–14.
- Ades F, Senterre C, Zardavas D, de Azambuja, E., Popescu, R., Parent, F., Piccart, M. An exploratory analysis of the factors leading to delays in cancer drug reimbursement in the European Union: the trastuzumab case. *Eur J Cancer*. 2014 Dec; 50(18):3089-97.
- Agnoli C, Grioni S, Sieri S, Sacerdote C, Ricceri F, Tumino R, Frasca G, Pala V, Mattiello A, Chiodini P, Iacoviello L, De Curtis A, Panico S, Krogh V. Metabolic syndrome and breast cancer risk: a case-cohort study nested in a multicentre Italian cohort. *PLoS One*. 2015 Jun 1;10(6):e0128891.
- Aka JA, Lin SX. Comparison of functional proteomic analyses of human breast cancer cell lines T47D and MCF7. *PLoS One*. 2012;7(2):e31532.
- Akaza H, Procopio G, Pripatnanont C, Facchini GV, Fava, S., Wheatley, D.. Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Previously Treated With Docetaxel-Based Chemotherapy: Treatment Patterns From the PROXIMA Prospective Registry *J Glob Oncol*. 2018; 1-12.
- Aras, U., Gandhi, Y.A., Masso-Welch, P.A., Morris, M.E. Chemopreventive and anti-angiogenic effects of dietary phenethyl isothiocyanate in an N-methyl nitrosourea-induced breast cancer animal model. *Biopharm. Drug Dispos*. 2013. 34(2):98-106.
- Aronchik, I., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. (2010). Direct inhibition of elastase activity by indole-3-carbinol

- triggers a CD40-TRAF regulatory cascade that disrupts NF-kappaB transcriptional activity in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 70(12): 4961-71.
- ASCO. American Society of Clinical Oncology [Sede Web] Alexandria, Virginia, 2021. Prostate Cancer: Statistics [acceso 1/4/2021] Disponible en: <https://www.cancer.net/cancer-types/prostate-cancer/statistics>
- ASCO. American Society of Clinical Oncology [Sede Web] Alexandria, Virginia, 2021 [acceso 1/4/2021] Disponible en: <https://www.cancer.net>
- Ashok, B.T., Chen, Y., Liu, X., Bradlow, H.L., Mittelman, A., Tiwari, R.K. (2001). Abrogation of estrogen-mediated cellular and biochemical effects by indole-3-carbinol. *Nutr. Cancer.* 41(1-2):180-7.
- Asociación Española contra el cancer [sede Web] (AECC). Madrid, 2021. [acceso: 01/04/2021] Disponible en: <https://www.aecc.es/es>
- ATCC® (American Type Culture Collection) [Base de datos en Internet], 2016. Disponible en: [https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo\\_country=es](https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=es)
- Atwell, L.L., Zhang, Z., Mori, M., Farris, P., Vetto, J.T., Naik, A.M., Oh, K.Y., Thuillier, P., Ho, E., Shannon, J. Sulforaphane Bioavailability and Chemopreventive Activity in Women Scheduled for Breast Biopsy. *Cancer Prev. Res. (Phila)* . 2015.8(12):1184-91.
- Azarenko, O., Jordan, M.A., Wilson, L. Erucin, the major isothiocyanate in arugula (*Eruca sativa*), inhibits proliferation of MCF7 tumor cells by suppressing microtubule dynamics. *PLoS One.* 2014. 20,9(6): 100599.
- Azarenko, O., Okouneva, T., Singletary, K.W., Jordan, M.A., Wilson, L. (2008) Suppression of microtubule dynamic instability and turnover in MCF7 breast cancer cells by sulforaphane. *Carcinogenesis.* 29(12): 2360-68.

- Bai, J., Li, Y., Zhang, G. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. *Cancer Biol Med.* 2017. 14: 348-62.
- Bai, S., Zhang, B.Y., Dong, Y. Impact of taxanes on androgen receptor signaling. *Asian J Androl* 2019. 21:249-52.
- Bao, C., Kim, M.C., Chen, J., Song, J., Ko, H.W., Lee, H.J. . Sulforaphene Interferes with Human Breast Cancer Cell Migration and Invasion through Inhibition of Hedgehog Signaling. *J. Agric. Food Chem.* 2016. 64(27): 5515-24.
- Barnum, K.J., O'Connell, M.J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods Mol. Biol.* 2014. 1170: 29–40.
- Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A.A., Kim, S. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature.* 2012. 48: 603-07.
- Barve, A, Khor, T.O., Hao, X., Keum, Y.S., Yang, C.S., Reddy B, Kong, AN. Murine prostate cancer inhibition by dietary phytochemicals curcumin and phenylethylisothiocyanate .*Pharm Res.* 2008 Sep; 25(9):2181-9.
- Baselga J, Cortés J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 109-19.
- Bauer, J.J., Sesterhenn, IA, Mostofi FK, McLeod DG, Srivastava S, Moul JW. Elevated levels of apoptosis regulator proteins p53 and bcl-2 are independent prognostic biomarkers in surgically treated clinically localized prostate cancer. *J Urol.* 1996 Oct; 156(4):1511-6.
- Becker, T.M., Juvik, J.A. The Role of Glucosinolate Hydrolysis Products from Brassica Vegetable Consumption in Inducing Antioxidant Activity and Reducing Cancer Incidence. *Diseases.* 2016 Jun 17;4(2):22.
- Berezovskaya, O., Schimmer, A.D., Glinskii, A.B., Pinilla, C., Hoffman, R.M., Reed, J.C., Glinsky, G.V. Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP

- contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *Cancer Res.* 2005 Mar 15; 65(6):2378-86.
- Biomodel UAH. [Internet] [Acceso 10/02/2021]. Disponible en: <http://biomodel.uah.es>.
- Bo, P., Lien, J.C., Chen, Y.Y., Yu, F.S., Lu, H.F., Yu, C.S., Chou, Y.C., Yu, C.C., Chung, J.G. Allyl Isothiocyanate Induces Cell Toxicity by Multiple Pathways in Human Breast Cancer Cells. *Am. J. Chin. Med.* 2016. 44(2): 415-37.
- Bos ,P.D., Zhang ,X.H., Nadal, C., Shu ,W., Gomis ,R.R., Nguyen, D.X., Minn, A.J., van de Vijver ,M.J., Gerald, W.L. Foekens, J.A., Massagué, J. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature.* 2009. 459(7249):1005-9.
- Bosetti ,C., Filomeno, M., Riso, P. ,Polesel, J., Levi, F., Talamini, R., Montella, M., Negri, E., Franceschi ,S., La Vecchia, C. Cruciferous vegetables and cancer risk in a network of case-control studies. *Ann Oncol.* 2012;23(8):2198-03.
- Boyanapalli, S.S., Li, W.1, Fuentes, F., Guo, Y., Ramirez, C.N., Gonzalez, X.P., Pung, D., Kong, A.N. Epigenetic reactivation of RASSF1A by phenethyl isothiocyanate (PEITC) and promotion of apoptosis in LNCaP cells. *Pharmacol Res.* 2016: 114: 175-84.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Sep 12. doi: 10.3322/caac.21492.
- Brenner T, Duggal S, Natale J. Treatment protocols for breast cancer. UpToDate.[internet] 2021[acceso 04/05/2021]. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/treatment-protocols-for-breast-cancer>.



- Brew, C.T., Aronchiks I., Hsu, J.C., Sheen, J.H., Dickson, R.B., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L.. Indole-3-carbinol activates the ATM signaling pathway independent of DNA damage to stabilize p53 and induce G1 arrest of human mammary epithelial cells. *Int J Cancer*. 2018; 118(4):857-68.
- Burke, A.J., Ali, H., O'Connell, E., Sullivan, F.J., Glynn, S.A. Sensitivity Profiles of Human Prostate Cancer Cell Lines to an 80 Kinase Inhibitor Panel. *Anticancer Res*. 2016 Feb;36(2):633-41.
- Cade, J.E., Taylor, E.F., Burley, V.J., Greenwood, D.C. Does the Mediterranean dietary pattern or the Healthy Diet Index influence the risk of breast cancer in a large British cohort of women? *Eur. J. Clin. Nutr*. 2011. 65(8): 920-928.
- Cailleau, R., Young, R., Olive, M., Reeves, W.J. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst*. 1974, 53: 661-74.
- Caldon, C.E., Daly, R.J., Sutherland, R.L., Musgrove, E.A. . Cell cycle control in breast cancer cells. *J. Cell Biochem*. 2006. 97(2): 261-74.
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2011. 490: 61–70.
- Cancer Research UK. Worldwide cancer incidence statistics [sede Web]. Angel Building, 407 St John Street, London EC1V 4AD. [actualizada en octubre de 2017; acceso 4 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/incidence>
- Cang, S., Ma, Y., Chiao, J.W., Liu, D. Phenethyl isothiocyanate and paclitaxel synergistically enhanced apoptosis and alpha-tubulin hyperacetylation in breast cancer cells. *Exp Hematol Oncol*. 2014. 3(1): 5.

- Capuano, E., Dekker M., Verkerk R., Oliviero T. Food as Pharma? The Case of Glucosinolates. *Curr Pharm Des.* 2017. 23(19):2697-2721.
- Caramia, G. L'alimentazione del bambino, la patologia cronica-degenerativa dell'adulto e la nutrigenomica [Childhood feeding, chronic-degenerative disease in adults, and nutrigenomics]. *Pediatr Med Chir.* 2007 Nov-Dec; 29(6):309-20.
- Carneiro, B.A., El-Deiry, W.S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2020; <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>
- Cartea, M.E., de Haro, A., Obregón, S., Soengas, P., Velasco, P. Glucosinolate variation in leaves of Brassica rapa crops. *Plant Foods Hum Nutr.* 2012 Sep;67(3):283-8.
- Caruso, J.A., Campana, R., Wei, C., Su, C.H., Hanks, A.M., Bornmann, W.G., Keyomarsi, K. Indole-3-carbinol and its N-alkoxy derivatives preferentially target ER $\alpha$ -positive breast cancer cells. *Cell Cycle.* 2014. 13(16): 2587-99.
- Chamberlain, N.L., Driver, D., Miesfeld, R.L. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res.* 1994. 22:3181-86.
- Chang, X., Tou, J.C., Hong, C., Kim, H.A., Riby, J.E., Firestone, G.L., Bjeldanes, L.F. 3,3'-Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice. *Carcinogenesis.* 2005. 26(4): 771-8.
- Chatterji, U., Riby, J.E., Taniguchi, T., Bjeldanes, E.L., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. Indole-3-carbinol stimulates transcription of the interferon gamma receptor 1 gene and augments interferon responsiveness in human breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 2004. 25(7): 1119-1128.
- Chavez, K.J., Garimella, S.V., Lipkowitz, S. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for

Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer.

*Breast Dis.* 2010. 32(1- 2):35–48.

- Chen, .L, Meng, S., Wang, H., Bali, P., Bai, W., Li, B., Atadja, P., Bhalla, K.N., Wu, J. Chemical ablation of androgen receptor in prostate cancer cells by the histone deacetylase inhibitor LAQ824. *Mol Cancer Ther.* 2005 Sep; 4(9):1311-9.
- Chiao, J.W., Wu, H., Ramaswamy, G., Conaway, C.C., Chung. F.L., Wang. L., Liu, D. Ingestion of an isothiocyanate metabolite from cruciferous vegetables inhibits growth of human prostate cancer cell xenografts by apoptosis and cell cycle arrest. *Carcinogenesis.* 2004 Aug; 25(8):1403-8.
- Chirumbolo, S., Bjørklund, G. Sulforaphane and 5-fluorouracil synergistically inducing autophagy in breast cancer: A possible role for the Nrf2-Keap1-ARE signaling?. *Food Chem Toxicol.* 2018.112:414-15.
- Cho, H.J., Lim, D.Y., Kwon, G.T., Kim, J.H., Huang, Z., Song, H., Oh, Y.S., Kang, Y.H., Lee KW, Dong Z, Park JH. Benzyl Isothiocyanate Inhibits Prostate Cancer Development in the Transgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate (TRAMP) Model, Which Is Associated with the Induction of Cell Cycle G1 Arrest. *Int J Mol Sci.* 2016 Feb 22; 17(2):264.
- Cho, S.D., Li, G., Hu, H., Jiang, C., Kang, K.S., Lee, Y.S., Kim, S.H. Lu, J. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in G2/M arrest and caspase-mediated apoptosis induced by sulforaphane in DU145 prostate cancer cells.*Nutr Cancer.* 2005; 52(2):213-24.
- Choi, S., Lew, K.L., Xiao, H., Herman-Antosiewicz A., Xiao D., Brown C.K., Singh S.V. D,L-Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is regulated by inhibitor of apoptosis family proteins and Apaf-1. *Carcinogenesis.* 2007;28:151–162.
- Choudhuri ,S. From Waddington's epigenetic landscape to small noncoding RNA: some important milestones in the

- history of epigenetics research. *Toxicol Mech Methods*. 2011 May;21(4):252-74.
- Clarke, J.D., Dashwood R.H., Ho E. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Lett*. 2008 Oct 8; 269(2):291-304.
- Cole, S.P. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a “multitasking” ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J. Biol. Chem*. 2014, 289, 30880–88.
- Comşa, S., Cîmpean, A.M., Raica, M. The Story of MCF7 Breast Cancer Cell Line: 40 Years of Experience in Research. *Anticancer Res*. 2015 Jun;35(6):3147-54.
- Concin, N., Zeillinger, C., Tong, J., Stimpfl, M., König, M., Print, D. Comparison of p53 mutational status with mRNA and protein expression in a panel of 24 human breast carcinoma cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2003;79:37-46.
- Cover, C.M., Hsieh, S.J., Tran, S.H., Hallden, G., Kim, G.S., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. (1998) Indole-3-carbinol inhibits the expression of cyclin-dependent kinase-6 and induces a G1 cell cycle arrest of human breast cancer cells independent of estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem*. 273(7): 3838-47.
- Cram, E.J., Liu, B.D., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. (2001). Indole-3-carbinol inhibits CDK6 expression in human MCF7 breast cancer cells by disrupting Sp1 transcription factor interactions with a composite element in the CDK6 gene promoter. *J. Biol. Chem*. 276(25): 22332-40.
- D'Amato, N.C., Gordon, M.A., Babbs, B., Spoelstra, N.S., Butterfield, K.T., Torkko, K.C. Cooperative dynamics of AR and ER activity in breast cancer. *Mol Cancer Res*. 2016. 14:1054–67.
- De Amicis, F., Thirugnansampathan, J., Cui, Y., Selever, J., Beyer, A., Parra, I. Androgen receptor overexpression induces tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 121:1–11
- De Iuliis, F., Salerno, G., Giuffrida, A., Milana, B., Taglieri,

- L., Rubinacci, G., Giantulli, S., Terella, F., Silvestri, I., Scarpa. S. Breast cancer cells respond differently to docetaxel depending on their phenotype and on survivin upregulation. *Tumour Biol.* 2016 Feb; 37(2):2603-11.
- De Santi, M., Galluzzi, L., Lucarini, S., Paoletti, M.F., Fraternale, A., Duranti, A., De Marco, C., Fanelli, M., Zaffaroni, N., Brandi, G., Magnani, M. The indole-3-carbinol cyclic tetrameric derivative CTet inhibits cell proliferation via overexpression of p21/CDKN1A in both estrogen receptor-positive and triple-negative breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res.* 2011.13(2):R33.
- Degner, S.C., Papoutsis, A.J., Selmin, O., Romagnolo, D.F. Targeting of aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of cyclooxygenase-2 expression by the indole-3-carbinol metabolite 3,3'-diindolylmethane in breast cancer cells. *J Nutr.* 2009. 139(1): 26-32.
- Delbridge, A.R.D.; Strasser, A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 2015, 22, 1071–1080.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., Leder, P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell.* 1995 Aug 25;82(4):675-84.
- Deschasaux, M., Huybrechts, I., Murphy, N., Julia, C., Hercberg, S., Srouf, B. Nutritional quality of food as represented by the FSAm-NPS nutrient profiling system underlying the Nutri-Score label and cancer risk in Europe: Results from the EPIC prospective cohort study. *PLoS Med.* 2018. 18:e1002651.
- Desmedt C, Fornili M, Clatot F, Demicheli R, De Bortoli D, Di Leo A, Viale G, de Azambuja E, Crown J, Francis PA, Sotiriou C, Piccart M, Biganzoli E. Differential Benefit of Adjuvant Docetaxel-Based Chemotherapy in Patients With Early Breast Cancer According to Baseline Body Mass Index. *J Clin Oncol.* 2020 Sep 1;38(25):2883-91.

- Di Zazzo, E., Galasso, G., Giovannelli, P., Di Donato, M., Castoria, G. Estrogens and Their Receptors in Prostate Cancer: Therapeutic Implications. *Front Oncol.* 2018 Jan 18;8:2.
- Dias, K., Dvorkin-Gheva, A., Hallett, RM., Wu, Y.; Hassell, J., Pond, G.R., et al., Claudin-Low Breast Cancer; Clinical & Pathological Characteristics. *PLoS One.* 2017. 12: e0168669
- Dong, L., Zieren, R.C., Xue, W., de Reijke, T.M., Pienta, K.J. Metastatic prostate cancer remains incurable, why? *Asian J Urol.* 2019. 6: 26–41.
- Dossus, L., Boutron-Ruault, M.C., Kaaks, R. Active and passive cigarette smoking and breast cancer risk: results from the EPIC cohort. *Int J Cancer.* 2014 Apr 15; 134(8):1871-88.
- Dumitrescu, R.G. (2018) Interplay Between Genetic and Epigenetic Changes in Breast Cancer Subtypes. *Methods Mol. Biol.* 1856: 19-34.
- EAU. Asociación europea de urología 2010. Guía clínica sobre el cáncer de próstata. [Monografía en Internet] [acceso:10/08/2021]. Disponible en: [https://www.aeu.es/UserFiles/01-GUIA\\_CLINICA\\_SOBRE\\_EL\\_CANCER\\_DE\\_PROSTATA.pdf](https://www.aeu.es/UserFiles/01-GUIA_CLINICA_SOBRE_EL_CANCER_DE_PROSTATA.pdf)
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993 Nov 19;75(4):817-25.
- Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007.35(4): 495–516.
- Emaus, M.J., Peeters, P.H., Bakker, M.F., Overvad, K. Vegetable and fruit consumption and the risk of hormone receptor-defined breast cancer in the EPIC cohort. *Am J Clin Nutr.* 2016 Jan;103(1):168-77.
- Esfandiari A, Saei A, McKenzie MJ, Matich AJ, Babalar M, Hunter DA. Preferentially enhancing anti-cancer

isothiocyanates over glucosinolates in broccoli sprouts: How NaCl and salicylic acid affect their formation. *Plant Physiol Biochem.* 2017 Jun;115:343-53.

- Eurocare-5. Registro Europeo del Cáncer [Base de datos en Internet] Italia, 2021. Instituto Superior de Sanidad [actualizada en abril, 2015; acceso 1/4/2021). Disponible en: <http://www.eurocare.it/Home/tabid/36/Default.aspx>
- Farha NG, Kasi A. Docetaxel. [Actualizado el 2 de diciembre de 2020]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 enero-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537242>
- Farsinejad-Marj, M., Talebi, S., Ghiyasvand, R., Miraghajani, M. Adherence to Mediterranean diet and risk of breast cancer in premenopausal and postmenopausal women. *Arch Iran Med.* 2015.18(11):786-792.
- Farvid MS, Chen WY, Rosner BA, Tamimi RM, Willett WC, Eliassen AH. Fruit and vegetable consumption and breast cancer incidence: Repeated measures over 30 years of follow-up. *Int J Cancer.* 2019 Apr 1;144(7):1496-1510.
- Feitelson MA, Arzumanyan A, Kulathinal RJ, Blain SW, Holcombe RF, Mahajna J, Marino M, Martinez-Chantar ML, Nawroth R, Sanchez-Garcia I, Sharma D, Saxena NK, Singh N, Vlachostergios PJ, Guo S, Honoki K, Fujii H, Georgakilas AG, Bilslund A, Amedei A, Niccolai E, Amin A, Ashraf SS, Boosani CS, Guha G, Ciriolo MR, Aquilano K, Chen S, Mohammed SI, Azmi AS, Bhakta D, Halicka D, Keith WN, Nowsheen S. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin Cancer Biol.* 2015 Dec; 35 Suppl:S25-S54
- Fimognari, C., Nüsse, M., Lenzi, M., Sciuscio, D., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P. Sulforaphane increases the efficacy of doxorubicin in mouse fibroblasts characterized by p53 mutations. *Mutat Res.*2006. 601(1-2): 92-101.
- Firestone, G.L., Bjeldanes, L.F. (2003) Indole-3-carbinol and 3-3'-diindolylmethane antiproliferative signaling pathways

- control cell-cycle gene transcription in human breast cancer cells by regulating promoter-Sp1 transcription factor interactions. *J. Nutr.* 133(7 Suppl): 2448S-2455S.
- Flores-Pérez, A.; Marchat, L.A.; Sánchez, L.L.; Romero-Zamora, D.; Arecha-ga-Ocampo, E.; Ramírez-Torres, N.; et al., Differential proteomic analysis reveals that EGCG inhibits HDGF and activates apoptosis to increase the sensitivity of non-small cells lung cancer to chemotherapy. *Proteomics Clin Appl* .2016.10:172-82.
- Formaggio, N., Rubin, M.A. & Theurillat, JP. Loss and revival of androgen receptor signaling in advanced prostate cancer. *Oncogene*. 2021. 40, 1205–16.
- Frank C, Sundquist J, Hemminki A, Hemminki K.. Familial Associations Between Prostate Cancer and Other Cancers *Eur Urol*. 2017 Feb;71(2):162-65.
- Franken N, Rodermond H, Stap J, Havemna J, Van Bree C. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat Protoc*. 2006; 1: 2315–19.
- Fuentes F, Paredes-Gonzalez X, Kong AN. Dietary glucosinolates sulforaphane, phenethyl isothiocyanate, indole-3-carbinol/3,3'-diindolylmethane: anti-oxidative stress/inflammation, Nrf2, epigenetics/epigenomics and *in vivo* cancer chemopreventive efficacy. *Current Pharmacology Reports*. 2015;1:179-96.
- Fujimura, T.; Takahashi, S.; Urano, T.; Kumagai, J.; Murata, T.; Takayama, K.; Ogushi, T.; Horie-Inoue, K.; Ouchi, Y.; Kitamura, T.; et al., Expression of cytochrome P450 3A4 and its clinical significance in human prostate cancer. *Urology* .2009. 74:391–97.
- Garcia, H.H., Brar, G.A., Nguyen, D.H., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. Indole-3-carbinol (I3C) inhibits cyclin-dependent kinase-2 function in human breast cancer cells by regulating the size distribution, associated cyclin E forms, and subcellular localization of the CDK2 protein complex. *J. Biol. Chem*. 2005. 280(10): 8756-64.



- Gene NCBI. National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. 2021. Archived URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.
- Genecards. The Human Gene Database. Weizmann Institute of Science. Archived URL: <https://www.genecards.org/2021>.
- Ghanbari P, Mohseni M, Tabasinezhad M, Yousefi B, Saei AA, Sharifi S et al. Inhibition of survivin restores the sensitivity of breast cancer cells to docetaxel and vinblastine. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014; 174(2):667-81.
- Gianfredi, V., Vannini, S., Moretti, M., Villarini, M., Bragazzi, N.L., Izzotti, A., Nucci, D. Sulforaphane and Epigallocatechin Gallate Restore Estrogen Receptor Expression by Modulating Epigenetic Events in the Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics*. 2017. 10(3-4): 126-35.
- Gibbs A, Schwartzman J, Deng V, Alumkal J. Sulforaphane destabilizes the androgen receptor in prostate cancer cells by inactivating histone deacetylase 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 29; 106(39):16663-8.
- Giovannelli P, Di Donato M, Giraldi T, Migliaccio A, Castoria G, Auricchio F. Targeting rapid action of sex steroid receptors in breast and prostate cancers. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011; 16:2224–32.
- Giovannelli, P., Di Donato, M., Auricchio, F. et al., Androgens Induce Invasiveness of Triple Negative Breast Cancer Cells Through AR/Src/PI3-K Complex Assembly. *Sci Rep* 2019. 9: 4490
- GLOBOCAN. Global Cancer Observatory. World Health Organization [base de datos en internet] Lyon, France (2020) [Fecha de acceso: 01/04/2021] Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today>.

- Goodspeed, A.; Heiser, L.M.; Gray, J.; Costello, J.C. Tumor-Derived Cell Lines as Molecular Models of Cancer Pharmacogenomics. *Mol Cancer Res* 2016. 14: 3–13.
- Gopalan A, Leversha MA, Satagopan JM, Zhou Q, Al-Ahmadie HA, Fine SW, Eastham JA, Scardino PT, Scher HI, Tickoo SK, Reuter VE, Gerald WL. TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy. *Cancer Res.* 2009 Feb 15; 69(4):1400-6.
- Grindstad, T., Richardsen, E., Andersen, S. et al., Progesterone Receptors in Prostate Cancer: Progesterone receptor B is the isoform associated with disease progression. *Sci Rep* 2018. 8. 11358.
- Gupta, P., Srivastava, S.K. Antitumor activity of phenethyl isothiocyanate in HER2-positive breast cancer models. *BMC Med.* 2018. 10: 80.
- Hahm ER, Chandra-Kuntal K, Desai D, Amin S, Singh SV. Notch activation is dispensable for D, L-sulforaphane-mediated inhibition of human prostate cancer cell migration. *PLoS One.* 2012; 7(9):e44957.
- Hahm, E.R., Singh, S.V. (2012) Bim contributes to phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis in breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* 51(6):465-74.
- Hait W.N. Anticancer drug development: the grand challenges.
- Hajra, S., Patra, A.R., Basu, A., Saha, P., Bhattacharya, S. (2018) Indole-3-Carbinol (I3C) enhances the sensitivity of murine breast adenocarcinoma cells to doxorubicin (DOX) through inhibition of NF- $\kappa$ B, blocking angiogenesis and regulation of mitochondrial apoptotic pathway. *Chem. Biol. Interact.* 2018. 290:19-36
- Han TL, Sha H, Ji J, Li YT, Wu DS, Lin H, Hu B, Jiang ZX. Depletion of Survivin suppresses docetaxel-induced apoptosis in HeLa cells by facilitating mitotic slippage. *Sci Rep.* 2021 Jan 27;11(1):2283.
- Harrell JC, Pfeifferle AD, Zalles N, Prat A, Fan C, Khramtsov A, Olopade OI, Troester MA, Dudley AC, Perou CM.

Endothelial-like properties of claudin-low breast cancer cells promote tumor vascular permeability and metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2014. 31(1):33–45.

Harvell DM, Spoelstra NS, Singh M, McManaman JL, Finlayson C, Phang T, et al., Molecular signatures of neoadjuvant endocrine therapy for breast cancer: characteristics of response or intrinsic resistance. *Breast Cancer Res Treat*. 2008; 112:475–88.

Harvie M, Howell A, Evans DG. Can diet and lifestyle prevent breast cancer: what is the evidence? *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015:e66-73.

He W, Sun Z, Liu Z. Silencing of TGM2 reverses epithelial to mesenchymal transition and modulates the chemosensitivity of breast cancer to docetaxel. *Exp Ther Med*. 2015; 10(4):1413-18.

Hejchman E, Taciak P, Kowalski S, Maciejewska D, Czajkowska A, Borowska J et al., Synthesis and anticancer activity of 7-hydroxycoumarinyl gallates. *Pharmacological Reports*. 2015; 67(2), 236-44.

Herman-Antosiewicz A, Xiao H, Lew KL, Singh SV. Induction of p21 protein protects against sulforaphane-induced mitotic arrest in LNCaP human prostate cancer cell line. *Mol Cancer Ther*. 2007 May; 6(5):1673-81.

Hero T, Bühler H, Nguemgo P, Priesch-Grzeszowiak B, Lateit T, Irenäus Anton Adamietz . The Triple-negative Breast Cancer Cell Line MDA-MB 231 Is Specifically Inhibited by the Ionophore Salinomycin. *Anticancer Res*. 2019 Jun; 39(6):2821-27.

Higdon, J.V., Delage, B., Williams, D.E., Roderick, H. Dashwood. Cruciferous Vegetables and Human Cancer Risk: Epidemiologic Evidence and Mechanistic Basis. *Pharmacol. Res*. 2007. 55(3): 224–36.

Holiday DL and Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, 2011. 13(14):215.

Hollestelle A, Nagel JHA, Smid M, Lam S, Elstrodt F, Wasielewski M et al.. Distinct gene mutation profiles

- among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 121:53–64.
- Hong, C., Firestone, G.L., Bjeldanes, L.F. Bcl-2 family-mediated apoptotic effects of 3,3'-diindolylmethane (DIM) in human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 2002.15;63(6):1085-97.
- Hopkins RJ, Van Dam NM, Van Loon JJA. Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Ann Rev Entomol.* 2009.54:57–83.
- Hsiao JJ, Ng BH, Smits MM, Wang J, Jasavala RJ, Martinez HD, Lee J, Alston JJ, Misonou H, Trimmer JS, Wright ME. Androgen receptor and chemokine receptors 4 and 7 form a signaling axis to regulate CXCL12-dependent cellular motility. *BMC Cancer.* 2015 Mar 31; 15:204.
- Hsu A, Wong CP, Yu Z, Williams DE, Dashwood RH, Ho E. Promoter de-methylation of cyclin D2 by sulforaphane in prostate cancer cells. *Clin Epigenetics.* 2011; 3:3.
- Hu, D.G.; Hickey, T.E.; Irvine, C.; Wijayakumara, D.D.; Lu, L.; Tilley, WD. Identification of androgen receptor splice variant transcripts in breast cancer cell lines and human tissues. *Horm Cancer.* 2014. 5: 61-71.
- Hua F, Shang S, Hu ZW. Seeking new anti-cancer agents from autophagy-regulating natural products. *J Asian Nat Prod Res.* 2017 Apr;19(4):305-13.
- Hudson TS, Perkins SN, Hursting SD, Young HA, Kim YS, Wang TC, Wang TT. Inhibition of androgen-responsive LNCaP prostate cancer cell tumor xenograft growth by dietary phenethyl isothiocyanate correlates with decreased angiogenesis and inhibition of cell attachment. *Int J Oncol.* 2012 Apr; 40(4):1113-21.
- Huggins C., Stevens R.E., Jr., Hodges C.V. Studies on prostatic cancer. II. The effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. *Arch. Surg.* 1941;43:209–23

- Hunakova, L., Sedlakova, O., Cholujova, D., Gronesova, P., Duraj, J., Sedlak, J. (2009). Modulation of markers associated with aggressive phenotype in MDA-MB-231 breast carcinoma cells by sulforaphane. *Neoplasma*. 56(6): 548-56.
- Hussain A, Mohsin J, Prabhu SA, Begum S, Nusri Qel-A, Harish G, Javed E, Khan MA, Sharma C. Sulforaphane inhibits growth of human breast cancer cells and augments the therapeutic index of the chemotherapeutic drug, gemcitabine. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(10):5855-60.
- Hwang ES, Lee HJ. Effects of phenylethyl isothiocyanate and its metabolite on cell-cycle arrest and apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Int J Food Sci Nutr*. 2010 May; 61(3):324-36.
- Hýžd'alová M, Procházková J, Strapáčová S, Svržková L, Vacek O, Fedr R, Andrysík Z, Hrubá E, Líbalová H, Kléma J, Topinka J, Mašek J, Souček K, Vondráček J, Machala M. A prolonged exposure of human lung carcinoma epithelial cells to benzo[a]pyrene induces p21-dependent epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-like phenotype. *Chemosphere*. 2021 Jan;263:128126.
- Ikezoe T, Hisatake Y, Takeuchi T, Ohtsuki Y, Yang Y, Said JW, Taguchi H, Koeffler HP. HIV-1 protease inhibitor, ritonavir: a potent inhibitor of CYP3A4, enhanced the anticancer effects of docetaxel in androgen-independent prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2004 Oct 15;64(20):7426-31.
- INE. (Diciembre 2019). Estadística de defunciones según causa de muerte. INE - España Eurostat. Disponible en: [https://www.ine.es/infografias/infografia\\_fallecidos\\_cancer.pdf](https://www.ine.es/infografias/infografia_fallecidos_cancer.pdf)
- Informe del consumo de alimentación en España 2017. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. [Monografía en Internet] Madrid, 2018. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/eu/alimentacion/temas/consum>

- O-  
tendencias/informeconsumoalimentacionenespana2017\_  
prefinal\_tcm35-456186.pdf
- International Agency for Research on Cancer. IARCTP53  
database. World Health Organization. Archived  
URL:<https://p53.iarc.fr/>
- Jackson, S.J., Singletary, K W., Venema, R.C. Sulforaphane  
suppresses angiogenesis and disrupts endothelial mitotic  
progression and microtubule polymerization. *Vascul.  
Pharmacol.* 2007.46(2): 77-84
- Jackson, S.J., Singletary, K.W. Sulforaphane inhibits human  
MCF7 mammary cancer cell mitotic progression and  
tubulin polymerization. *J. Nutr.* 2004.134(9): 2229-36.
- Jackson, S.J., Singletary, K.W. Sulforaphane: a naturally  
occurring mammary carcinoma mitotic inhibitor, which  
disrupts tubulin polymerization. *Carcinogenesis.* 2004.  
25(2): 219-27.
- Jane V. Higdon, § Barbara Delage, David E. Williams, and  
Roderick H. Dashwood Cruciferous Vegetables and  
Human Cancer Risk: Epidemiologic Evidence and  
Mechanistic Basis. 2007 Mar; *Pharmacol Res.* 55(3):  
224–36.
- Jayakumar, S.; Kunwar, A.; Sandur, S.K.; Pandey, B.N.;  
Chaubey, R.C. Differential response of DU 145 and PC3  
prostate cancer cells to ionizing radiation: Role of  
reactive oxygen species, GSH and Nrf2 in  
radiosensitivity. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014.1840:  
485–94.
- Jernberg, E.; Bergh, A.; Wikström, P. Clinical relevance of  
androgen receptor alterations in prostate cancer. *Endocr.  
Connect.* 2017. 6: R146–R161
- Jia T, Zhang L, Duan Y, Zhang M, Wang G, Zhang J, Zhao  
Z. The differential susceptibilities of MCF7 and MDA-  
MB-231 cells to the cytotoxic effects of curcumin are  
associated with the PI3K/Akt-SKP2-Cip/Kips pathway.  
*Cancer Cell Int.* 2014; 30;14(1):126.

- Jiang, G., Zhang, S., Yazdanparast, A. Li, M., Pawar, A.V.; Liu, Y., et al., Comprehensive comparison of molecular portraits between cell lines and tumors in breast cancer. *BMC Genomics*. 2016. 17:525.
- Jividen, K. Yang, C.S.; Szlachta, K; Ratan, A; Paschal, B.M. Genomic analysis of DNA repair genes and androgen signaling in prostate cancer. *BMC Cancer*. 2018 10;18(1):960.
- Kaczyńska, A. Combination of lapatinib with isothiocyanates overcomes drug resistance and inhibits migration of HER2 positive breast cancer cells Świerczyńska J, Herman-Antosiewicz A. Sensitization of HER2 Positive Breast Cancer Cells to Lapatinib Using Plants-Derived Isothiocyanates. *Nutr. Cancer*. 2015. 67(6): 976-86.
- Kaczyńska, A., Herman-Antosiewicz, A. Combination of lapatinib with isothiocyanates overcomes drug resistance and inhibits migration of HER2 positive breast cancer cells. *Breast Cancer*. 2017. 24(2): 271-80.
- Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ*. 2018 Jan;25(1):65-80
- Kalkavan, H.; Green, D. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ*. 2018, 25, 46–55.
- Kanematsu, S., Uehara, N., Miki, H., Yoshizawa, K., Kawanaka, A., Yuri, T., Tsubura, A.(2010). Autophagy inhibition enhances sulforaphane-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Anticancer Res*. (9): 3381-90.
- Kanematsu, S., Uehara, N., Miki, H., Yoshizawa, K., Kawanaka, A., Yuri, T., Tsubura, A. Autophagy inhibition enhances sulforaphane-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Anticancer Res*. 2010. 30(9): 3381-90.
- Kang J, Park JH, Lee HJ, Jo U, Park JK, Seo JH, Kim YH, Kim I, Park KH. Caveolin-1 Modulates Docetaxel-Induced Cell Death in Breast Cancer Cell Subtypes through Different Mechanisms. *Cancer Res Treat*. 2016 Apr;48(2):715-26.



- Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi YL, Girard L, Gandhi J, Kwei KA, Hernandez-Boussard T, Wang P, Gazdar AF, Minna JD, Pollack JR. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One*. 2009; 4:e6146.
- Karamouzis MV, Papavassiliou KA, Adamopoulos C, Papavassiliou AG. Review. Targeting Androgen/Estrogen Receptors Crosstalk in Cancer. *Trends Cancer*. 2016 Jan; 2(1):35-48.
- Keller PJ, Lin AF, Arendt LM, Klebba I, Jones AD, Rudnick JA, Dimeo TA, Gilmore H, Jefferson DM, Graham RA, Naber SP, Schnitt S, Kuperwasser C. Mapping the cellular and molecular heterogeneity of normal and malignant breast tissues and cultured cell lines. *Breast Cancer Res*. 2010; 12: R87.
- Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT, Lorenz K, Lee EH, Barcellos-Hoff MH, Petersen OW, Gray JW, Bissell MJ. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol*, 2007. 1(1):84–96.
- Kilic, U.; Sahin, K.; Tuzcu, M.; Basak, N.; Orhan,C.; Elibol-Can, B.; et al., En-hancement of Cisplatin sensitivity in human cervical cancer: epigallocatechin-3-gallate. *Front Nutr* 2015. 1:28.
- Kim EM, Jung CH, Song JY, Park JK, Um HD. Pro-apoptotic Bax promotes mesenchymal-epithelial transition by binding to respiratory complex-I and antagonizing the malignant actions of pro-survival Bcl-2 proteins. *Cancer Lett*. 2018 Jun 28; 424:127-135.
- Kim, E.J., Hong, J.E., Eom, S.J., Lee, J.Y., Park, J.H. Oral administration of benzyl-isothiocyanate inhibits solid tumor growth and lung metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells in BALB/c mice. *Breast Cancer Res. Treat*. 2011. 130(1): 61-71.



- Kim, S.H., Nagalingam, A., Saxena, N.K., Singh, S.V., Sharma, D. Benzyl isothiocyanate inhibits oncogenic actions of leptin in human breast cancer cells by suppressing activation of signal transducer and activator of transcription 3. *Carcinogenesis*. 2011.32(3): 359-67.
- Kim, S.H., Sehrawat, A., Singh, S.V. Dietary chemopreventative benzyl isothiocyanate inhibits breast cancer stem cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Prev. Res.* (Phila). 2013.6(8):782-90.
- Kim, S.H., Singh, S.V. p53-Independent apoptosis by benzyl isothiocyanate in human breast cancer cells is mediated by suppression of XIAP expression. *Cancer Prev. Res.* (Phila). 2010. 3(6):718-26.
- Kondo, Y., Kondo, S. Autophagy and cancer therapy. *Autophagy*. 2006. 2(2): 85-90.
- Kyriakopoulos C. et al., Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer: Long-Term Survival Analysis of the Randomized Phase III E3805 CHAARTED Trial. *J Clin Oncol*. 2018 Apr 10;36(11):1080-87
- Labsch S, Liu L, Bauer N, Zhang Y, Aleksandrowicz E, Gladkich J, Schönsiegel F, Herr I. Sulforaphane and TRAIL induce a synergistic elimination of advanced prostate cancer stem-like cells. *Int J Oncol*. 2014 May; 44(5):1470-80.
- Lafront, C.; Germain, L. .; Weidmann, C. Audet-Walsh, É. A Systematic Study of the Impact of Estrogens and Selective Estrogen Receptor Modulators on Prostate Cancer Cell Proliferation. *Sci Rep* 2020. 10: 4024.
- Lam TK, Gallicchio L, Lindsley K, Shiels M, Hammond E, Tao XG, Chen L, Robinson KA, Caulfield LE, Herman JG, Guallar E, Alberg AJ. Cruciferous vegetable consumption and lung cancer risk: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Jan;18(1):184-95.

- Lamy PJ, Trétarre B, Rebillard X, Sanchez M, Cénée S, Ménégau F. Family history of breast cancer increases the risk of prostate cancer: results from the EPICAP study. *Oncotarget*. 2018 May 4;9(34):23661-69.
- Lanzino M, De Amicis F, McPhaul MJ, Marsico S, Panno ML, Andò S. Endogenous coactivator ARA70 interacts with estrogen receptoralpha (ERalpha) and modulates the functional ERalpha/androgenreceptor interplay in MCF7 cells. *J Biol Chem*. 2005; 280:20421–30.
- Lee HY, Oh SH, Suh YA, Baek JH, Papadimitrakopoulou V, Huang S et al., Response of non-small cell lung cancer cells to the inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- and MAPK kinase 4/c-Jun NH2-terminal kinase pathways: an effective therapeutic strategy for lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2005; 11(16): 6065-74.
- Lee, I.J., Han, F., Baek, J., Hisatsune, A., Kim, K.C. Inhibition of MUC1 expression by indole-3-carbinol. *Int. J. Cancer*. 2004. 109(6): 810-16.
- Lee, J.W., Cho, M.K. Phenethyl isothiocyanate induced apoptosis via down-regulation of Bcl-2/XIAP and triggering of the mitochondrial pathway in MCF7 cells. *Arch. Pharm. Res*. 2008. 31(12):1604-112.
- Lewinska, A., Adamczyk-Grochala, J., Deregowska, A., Wnuk, M. Sulforaphane-Induced Cell Cycle Arrest and Senescence are accompanied by DNA Hypomethylation and Changes in microRNA Profile in Breast Cancer Cells. *Theranostics*. 2017.7(14):3461-77.
- Li RW, Li C, Wang TT. Transcriptomic alterations in human prostate cancer cell LNCaP tumor xenograft modulated by dietary phenethyl isothiocyanate. *Mol Carcinog*. 2013 Jun; 52(6):426-37.
- Li WJ, Zhong SL, Wu YJ, Xu WD, Xu JJ, Tang JH, Zhao JH. Systematic expression analysis of genes related to multidrug-resistance in isogenic docetaxel- and adriamycin-resistant breast cancer cell lines. *Mol Biol*

*Rep.* 2013 Nov;40(11):6143-50.

- Li XL, Hara T, Choi Y, Subramanian M, Francis P, Bilke S, Walker RL, Pineda M, Zhu Y, Yang Y, Luo J, Wakefield LM, Brabletz T, Park BH, Sharma S, Chowdhury D, Meltzer PS, Lal A. A p21-ZEB1 complex inhibits epithelial-mesenchymal transition through the microRNA 183-96-182 cluster. *Mol Cell Biol.* 2014 Feb;34(3):533-50.
- Li, G., Zhou, J., Budhraj, A., Hu, X., Chen, Y., Cheng, Q., Liu, L., Zhou, T., Li, P., Liu, E., Gao, N. Mitochondrial translocation and interaction of cofilin and Drp1 are required for erucin-induced mitochondrial fission and apoptosis. *Oncotarget.* 2017. 30;(3):1834-49.
- Li, Y., Buckhaults, P., Li, S., Tollefsbol, T. Temporal Efficacy of a Sulforaphane-Based Broccoli Sprout Diet in Prevention of Breast Cancer through Modulation of Epigenetic Mechanisms. *Cancer Prev. Res. (Phila).* 2018. 11(8): 451-64.
- Liao XH, Lu DL, Wang N, Liu LY, Wang Y, Li YQ, Yan TB, Sun XG, Hu P, Zhang TC. Estrogen receptor  $\alpha$  mediates proliferation of breast cancer MCF-7 cells via a p21/PCNA/E2F1-dependent pathway. *FEBS J.* 2014 Feb;281(3):927-42.
- Lin T, Zirpoli GR, McCann SE, Moysich KB, Ambrosone CB, Tang L. Trends in Cruciferous Vegetable Consumption and Associations with Breast Cancer Risk: A Case-Control Study. *Curr Dev Nutr.* 2017 Jul 18;1(8):e000448..
- Lin Y, Fukuchi J, Hiipakka RA, Kokontis JM, Xiang J. Up-regulation of Bcl-2 is required for the progression of prostate cancer cells from an androgen-dependent to an androgen-independent growth stage. *Cell Res.* 2007 Jun; 17(6):531-6.
- Liu H, Zang C, Fenner MH, Possinger K, Elstner E. PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of

- human breast cancer cells *in vitro*. *Breast Cancer Res Treat*. 2003. 79(1):63-74.
- Liu KC, Huang YT, Wu PP, Ji BC, Yang JS, Yang JL, Chiu TH, Chueh FS, Chung JG. The roles of AIF and Endo G in the apoptotic effects of benzyl isothiocyanate on DU 145 human prostate cancer cells via the mitochondrial signaling pathway. *Int J Oncol*. 2011 Mar; 38(3):787-96.
- Liu Z, Ding Y, Ye N, Wild C, Chen H, Zhou J. Direct Activation of Bax Protein for Cancer Therapy. *Med Res Rev*. 2016 Mar;36(2):313-41.
- Liu, K., Cang, S., Ma, Y., Chiao, J.W. Synergistic effect of paclitaxel and epigenetic agent phenethyl isothiocyanate on growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Cell. Int*. 2013.13(1): 10.
- López-Guarnido O1, Álvarez-Cubero MJ2, Saiz M3, Lozano D4, Rodrigo L5, Pascual M6, Cozar JM7, Rivas A8. Mediterranean diet adherence and prostate cancer risk. 2014. Oct. *Nutr Hosp*. 31;31(3):1012-9.
- Lumachi, F; Santeufemia, D.A; Basso,S.M. Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *World J Biol Chem*. 2015.6:231-39.
- Mackay A, Tamber N, Fenwick K, Iravani M, Grigoriadis A, Dexter T, Lord CJ, Reis-Filho JS, Ashworth A. A high-resolution integrated analysis of genetic and expression profiles of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 2009: 118:481–98.
- Magklara, A.; Brown, T.J, .; Diamandis, E. P. Characterization of androgen receptor and nuclear receptor co-regulator expression in human breast cancer cell lines exhibiting differential regulation of kallikreins 2 and 3. *Int J Cancer* 2002, 100, 507-14.
- Maguire, O.; Pollock, C.; Martin, P.; Owen, A.; Smyth, T.; Doherty, D.; Campbell, M.J.; McClean, S.; Thompson, P. Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 expression and modulation of “intracrine” metabolism of androgens in

prostate cells by liganded vitamin D receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 2012, 364:54–64.

- Marconett, C.N., Sundar, S.N., Tseng, M., Tin, A.S., Tran, K.Q., Mahuron, K.M., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. Indole-3-carbinol downregulation of telomerase gene expression requires the inhibition of estrogen receptor-alpha and Sp1 transcription factor interactions within the hTERT promoter and mediates the G1 cell cycle arrest of human breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 2011.32(9): 1315-23.
- Marconett, CN., Singhal, A.K., Sundar, S.N., Firestone, G.L. Indole-3-carbinol disrupts estrogen receptor-alpha dependent expression of insulin-like growth factor-1 receptor and insulin receptor substrate-1 and proliferation of human breast cancer cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 2012.363(1-2): 74-84.
- Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer.* 2001 Dec; 1(3):194-202.
- Marrocco DL, Tilley WD, Bianco-Miotto T, Evdokiou A, Scher HI, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM, Butler LM. Suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat) represses androgen receptor expression and acts synergistically with an androgen receptor antagonist to inhibit prostate cancer cell proliferation. *Mol Cancer Ther.* 2007 Jan; 6(1):51-60.
- Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Virmani AK, Zöchbauer-Müller S, Farinas AJ, Minna JD, McConnell J, Frenkel EP, Gazdar AF. Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res.* 2002 Feb; 8(2):514-9.
- Matsushima H, Kitamura T, Goto T, Hosaka Y, Homma Y, Kawabe K. Combined analysis with Bcl-2 and P53 immunostaining predicts poorer prognosis in prostatic carcinoma. *J Urol.* 1997 Dec; 158(6):2278-83.

- McLoughlin, EC.; 'Boyle, N.M. Colchicine-Binding Site Inhibitors from Chemistry to Clinic: A Review. *Pharmaceuticals* (Basel) 2020. 13.; 8. Erratum in: *Pharmaceuticals* (Basel). 2020.13.;72.
- Meeran SM, Patel SN, Li Y, Shukla S, Tollefsbol TO. Bioactive dietary supplements reactivate ER expression in ER-negative breast cancer cells by active chromatin modifications. *PLoS One*. 2012; 7(5):e37748.
- Meng, Q., Goldberg, I.D., Rosen, E.M., Fan, S. Inhibitory effects of Indole-3-carbinol on invasion and migration in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 2000a. 63(2): 147-52.
- Meng, Q., Qi, M., Chen, D.Z., Yuan, R., Goldberg, I.D., Rosen, E.M., Auburn, K., Fan, S. Suppression of breast cancer invasion and migration by indole-3-carbinol: associated with up-regulation of BRCA1 and E-cadherin/catenin complexes. *J. Mol. Med* (Berl). 2000b.78(3): 155-65.
- Mi, L.; Gan, N.; Cheema, A.; Dakshanamurthy, S.; Wang, X.; Yang, D.C.; Chung, F.L. Cancer preventive isothiocyanates induce selective degradation of cellular alpha- and beta-tubulins by proteasomes. *J. Biol. Chem.* 2009. 284: 17039–51.
- Migliaccio A, Castoria G, de Falco A, Bilancio A, Giovannelli P, DiDonato M, et al., Polyproline and Tat transduction peptides in the study of the rapid actions of steroid receptors. *Steroids*. 2012; 77:974–78.
- Milczarek, M., Wiktorska, K., Mielczarek, L., Koronkiewicz, M., Dąbrowska, A., Lubelska, K., Matosiuk, D., Chilmonczyk, Z. (2018) Autophagic cell death and premature senescence: New mechanism of 5-fluorouracil and sulforaphane synergistic anticancer effect in MDA-MB-231 triple negative breast cancer cell line. *Food Chem. Toxicol.* 111: 1-8.
- Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massagué J. Genes that

mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, 2005. 436(7050):518-24.

- Misawa A and Inoue S. Estrogen-Related Receptors in Breast Cancer and Prostate Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015; 6: 83.
- Mladkova J, Sanda M, Matouskova E, Selicharova I. Phenotyping breast cancer cell lines EM-G3, HCC1937, MCF7 and MDA-MB-231 using 2-D electrophoresis and affinity chromatography for glutathione-binding proteins. *BMC Cancer* 2010 10:449
- Moiseeva, E.P., Heukers, R., Manson, M.M. EGFR and Src are involved in indole-3-carbinol-induced death and cell cycle arrest of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2007.28(2): 435-45.
- Monks NR, Li B, Gunjan S, Rogers DT, Kulshrestha M, Falcone DL et al., Natural products genomics: A novel approach for the discovery of anticancer therapeutics. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2011;64:217–25.
- Moon YJ, Brazeau DA, Morris ME. Dietary phenethyl isothiocyanate alters gene expression in human breast cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011;2011:462525.
- Moran, D.M.; Mak, C.G. Nutlin-3a induces cytoskeletal rearrangement and inhibits the migration and invasion capacity of p53 wild-type cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2010, 9, 895–905.
- Mota, A.L.; Evangelista, A.F.; Macedo, T.; Oliveira, R.; Scapulatempo-Neto, C.; Vieira, R.A.; Marques, M.M.C. Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. *Oncol Lett*. 2017; 13 :4708-4712.
- Myzak MC, Dashwood WM, Orner GA, Ho E, Dashwood RH. Sulforaphane inhibits histone deacetylase *in vivo* and suppresses tumorigenesis in Apc-minus mice. *FASEB J*. 2006a Mar; 20(3):506-8.

- Myzak MC, Hardin K, Wang R, Dashwood RH, Ho E. Sulforaphane inhibits histone deacetylase activity in BPH-1, LnCaP and PC3 prostate epithelial cells. *Carcinogenesis*. 2006b Apr; 27(4):811-9.
- Myzak MC, Tong P, Dashwood WM, Dashwood RH, Ho E. Sulforaphane retards the growth of human PC3 xenografts and inhibits HDAC activity in human subjects. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007 Feb; 232(2):227-34.
- Nallani SC, Goodwin B, Buckley AR, Buckley DJ, Desai PB. Differences in the induction of cytochrome P450 3A4 by taxane anticancer drugs, docetaxel and paclitaxel, assessed employing primary human hepatocytes. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004 Sep; 54(3):219-29.
- Namekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells. *Cells*. 2019 Jan 20; 8(1):74.
- Natella F, Maldini M, Nardini M, Azzini E, Foddai MS, Giusti AM, Baima S, Morelli G, Scaccini C. Improvement of the nutraceutical quality of broccoli sprouts by elicitation. *Food Chem*. 2016 Jun 15; 201:101-9.
- NCCN (National Comprehensive Cancer Network) guidelines® version 3.2021. Invasive Breast Cancer. Disponible en: <https://www.nccn.org>
- NCT00005883 Phenethyl Isothiocyanate in Preventing Lung Cancer in People Who Smoke. Last Update Posted: March 28, 2011. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00005883>
- NCT00691132 Phenethyl Isothiocyanate in Preventing Lung Cancer in Smokers Last Update Posted: May 12, 2017. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00691132>
- NCT00843167 Broccoli Sprout Extract in Treating Women Who Have Had a Mammogram and Breast Biopsy. Last Update Posted: April 27, 2017.



<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00843167>

- NCT00982319. Study to Evaluate the Effect of Sulforaphane in Broccoli Sprout Extract on Breast Tissue. Last Update Posted November 21, 2018. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00982319>.
- NCT01612910 Oral Microencapsulated Diindolylmethane in Treating Patients With Stage II-III Triple Negative, Androgen Receptor Positive Breast Cancer Who Have Undergone Chemotherapy and Surgery. Last Update Posted: February 12, 2014. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01612910>
- NCT02970682 SFX-01 in the Treatment and Evaluation of Metastatic Breast Cancer (STEM). Last Update Posted: July 12, 2019. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02970682>
- Negri-Cesi, P.; Colciago, A.; Poletti, A.; Motta, M. 5 $\alpha$ -reductase isozymes and aromatase are differentially expressed and active in the androgen-independent human prostate cancer cell lines DU145 and PC3. *Prostate*.1999. 41: 224–32.
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T et al., A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 2006;10:515–27.
- Nguyen, H.H., Aronchik, I., Brar, G.A., Nguyen, D.H., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. The dietary phytochemical indole-3-carbinol is a natural elastase enzymatic inhibitor that disrupts cyclin E protein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008.105(50): 19750-55.
- Nguyen, H.H., Lavrenov, S.N., Sundar, S.N., Nguyen, D.H., Tseng, M., Marconett, C.N., Kung, J., Staub, R.E. Preobrazhenskaya MN, Bjeldanes LF, Firestone GL. 1-Benzyl-indole-3-carbinol is a novel indole-3-carbinol derivative with significantly enhanced potency of anti-

- proliferative and anti-estrogenic properties in human breast cancer cells. *Chem Biol Interact.* 2016. 186(3): 255-266
- Novío, S., Cartea, E., Soengas, P., Freire-Garabal, M., Núñez-Iglesias, M.J. Effects of Brassicaceae Isothiocyanates on Prostate Cancer. *Molecules.* 2016.21(5): 626.
- Novío, S.; Freire-Garabal, M.; Núñez, M.J. Target driven preclinical cribado for new antimitotic chemotherapy agents. *Curr TopMed Chem.* 2014.14: 2263–71.
- Núñez-Iglesias MJ, Novío S, García C, Pérez-Muñuzuri E, Soengas P, Cartea E, Velasco P, Freire-Garabal M. Glucosinolate-Degradation Products as Co-Adjuvant Therapy on Prostate Cancer in Vitro. *Int J Mol Sci.* 2019 9;20(20):4977.
- Ociepa-Zawal, M., Rubiś, B., Laciński, M., Trzeciak, W.H. The effect of indole-3-carbinol on the expression of CYP1A1, CYP1B1 and AhR genes and proliferation of MCF7 cells. *Acta Biochim. Pol.* 2007.54(1):113-17.
- Oh ET, Kim CW, Kim SJ, Lee JS, Hong SS, Park HJ Docetaxel induced-JNK2/PHD1 signaling pathway increases degradation of HIF-1 $\alpha$  and causes cancer cell death under hypoxia. *Sci Rep.* 2016 Jun 6;6:27382.
- Ojo D, Lin X, Wong N, Gu Y, Tang D. Prostate Cancer Stem-like Cells Contribute to the Development of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers (Basel).* 2015 Nov 18; 7(4):2290-308.
- Oncoguía SEGO: Cáncer infiltrante de mama. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. *Publicaciones SEGO.* Junio 2017.
- Pan, X.; Zhao, B.; Song, Z.; Han, S.; Wang, M. Estrogen receptor- $\alpha$ 36 is involved in epigallocatechin-3-gallate induced growth inhibition of ER-negative breast cancer stem/progenitor cells. *J Pharmacol Sci.* 2016. 130: 85-93.
- Papadopoulou, N.; Papakonstanti, E.A.; Kallergi, G., Alevizopoulos, K.; Stournaras, C. Membrane androgen

receptor activation in prostate and breast tumor cells: molecular signaling and clinical impact. *IUBMB Life* 2009. 61:56-61.

Parker, C.; Castro, E.; Fizazi, K.; Heidenreich, A.; Ost, P.; Procopio, G.; Tombal, B.; Gillessen, S. ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2020. 31: 1119-34.

Parveen A, Akash MS, Rehman K, Kyunn WW. Dual Role of p21 in the Progression of Cancer and Its Treatment. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2016;26(1):49-62.

Pawlik, A., Słomińska-Wojewódzka, M., Herman-Antosiewicz, A. Sensitization of estrogen receptor-positive breast cancer cell lines to 4-hydroxytamoxifen by isothiocyanates present in cruciferous plants. *Eur J Nutr.* 2016. 55(3): 1165-80.

Peng X, Zhou Y, Tian H, Yang G, Li C, Geng Y, Wu S, Wu W Sulforaphane inhibits invasion by phosphorylating ERK1/2 to regulate E-cadherin and CD44v6 in human prostate cancer DU145 cells. *Oncol Rep.* 2015 Sep; 34(3):1565-72.

Peters AA, Buchanan G, Ricciardelli C, Bianco-Miotto T, Centenera MM, Harris JM, et al., Androgen receptor inhibits estrogen receptor- $\alpha$  activity and is prognostic in breast cancer. *Cancer Res.* 2009 Aug 1; 69(15):6131-40.

Pledge-Tracy, A., Sobolewski, M.D., Davidson, N.E. Sulforaphane induces cell type-specific apoptosis in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer Ther.* 2007. 6(3): 1013-1021.

Popolo, A., Pinto, A., Daglia, M., Nabavi, S.F., Farooqi, A.A., Rastrelli, L. Two likely targets for the anti-cancer effect of indole derivatives from cruciferous vegetables: PI3K/Akt/mTOR signalling pathway and the aryl hydrocarbon receptor. *Semin. Cancer Biol.* 2017.46:132-37.

- Pore, S.K., Hahm, E.R., Latoche, J.D., Anderson, C.J., Shuai, Y., Singh, S.V. Prevention of breast cancer-induced osteolytic bone resorption by benzyl isothiocyanate. *Carcinogenesis*. 2018.39(2): 134-45.
- Powolny AA, Bommareddy A, Hahm ER, Normolle DP, Beumer JH, Nelson JB, Singh SV. Chemopreventative potential of the cruciferous vegetable constituent phenethyl isothiocyanate in a mouse model of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2011. Apr 6; 103(7):571-84.
- Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol*. 2017; 1601:1-17.
- Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12:R68.
- Prełowska, M., Kaczyńska, A., Herman-Antosiewicz, A. (2017) 4-(Methylthio)butyl isothiocyanate inhibits the proliferation of breast cancer cells with different receptor status. *Pharmacol. Rep.* 69(5): 1059-66.
- Przystupski, D.; Michel, O.; Rossowska, J. et al., The modulatory effect of green tea catechin on drug resistance in human ovarian cancer cells. *Med Chem Res* 2019, 28, 657–67.
- Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitman JS, Buttyan R, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitman JS, Buttyan R. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis *in vitro* and confers resistance to androgen depletion *in vivo*. *Cancer Res*. 1995 Oct 1; 55(19):4438-45.
- Rahman, K.M., Aranha, O., Glazyrin, A., Chinni, S.R., Sarkar, F.H. Translocation of Bax to mitochondria induces apoptotic cell death in indole-3-carbinol (I3C) treated breast cancer cells. *Oncogene*. 2000.19(50):5764-71.
- Rahman, K.M., Aranha, O., Sarkar, F.H. Indole-3-carbinol (I3C) induces apoptosis in tumorigenic but not in

nontumorigenic breast epithelial cells. *Nutr Cancer*. 2003.45(1): 101-112.

Rahman, K.M., Li, Y., Sarkar, F.H. Inactivation of akt and NF-kappaB play important roles during indole-3-carbinol-induced apoptosis in breast cancer cells. *Nutr. Cancer*. 2004.48(1): 84-94.

Rahman, K.W., Sarkar, F.H. Inhibition of nuclear translocation of nuclear factor-{kappa}B contributes to 3,3'-diindolylmethane-induced apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2005.65(1): 364-71.

Rao, C.V. Benzyl isothiocyanate: double trouble for breast cancer cells. *Cancer Prev. Res. (Phila)*.2013. 6(8): 760-63.

Raudenska M, Kratochvilova M, Vicar T, Gumulec J, Balvan J, Polanska H, Pribyl J, Masarik M. Cisplatin enhances cell stiffness and decreases invasiveness rate in prostate cancer cells by actin accumulation. *Sci Rep*. 2019 Feb 7;9(1):1660.

Riby, J.E., Feng, C., Chang, Y.C., Schaldach, C.M., Firestone, G.L., Bjeldanes, L.F. The major cyclic trimeric product of indole-3-carbinol is a strong agonist of the estrogen receptor signaling pathway. *Biochemistry*. 2000.39(5): 910-18.

Risbridger GP, Davis ID, Birrell SN, Tilley WD. Breast and prostate cancer: more similar than different. *Nat Rev Cancer*. 2010 Mar;10(3):205-12

Riss TL, Moravec RA, Niles A, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ et al., Cell Viability Assays. En: Assay Guidance Manual [eBook]. [Publicado 1 mayo, 2013; Última actualización: 1 febrero, 2020]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

Rodríguez-Berriguete G, Torrealba N, Ortega MA, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, Paniagua R, Guil-Cid M, Fraile B, Royuela M. Prognostic value of inhibitors of

- apoptosis proteins (IAPs) and caspases in prostate cancer: caspase-3 forms and XIAP predict biochemical progression after radical prostatectomy. *BMC Cancer*. 2015. Oct 27; 15:809.
- Roomi MW, Niedzwiecki A, Rath M. Scientific Evaluation of Dietary Factors in Cancer. *J Nutri Med Diet Care*. 2018;4(1):0-29.
- Royston KS, Tollefsbol TO. The Epigenetic Impact of Cruciferous Vegetables on Cancer Prevention. *Curr Pharmacol.Rep*. 2015.1(1): 46–51.
- Sakao K, Desineni S, Hahm ER, Singh SV. Phenethyl isothiocyanate suppresses inhibitor of apoptosis family protein expression in prostate cancer cells in culture and *in vivo*. *Prostate*. 2012 Jul 1; 72(10):1104-16.
- Sakao, K., Hahm, E.R., Singh, S.V. *In vitro* and *in vivo* effects of phenethyl isothiocyanate treatment on vimentin protein expression in cancer cells. *Nutr. Cancer*. 2013. 65 (Suppl 1): 61-7.
- Sampayo, R; Recouvreux, S; Simian, M. The hyperplastic phenotype in PR-A and PR-B transgenic mice: lessons on the role of estrogen and progesterone receptors in the mouse mammary gland and breast cancer. *Vitam Horm* 2013.93: 185-201.
- Sánchez-Pujante PJ, Borja-Martínez M, Pedreño MÁ, Almagro L. Biosynthesis and bioactivity of glucosinolates and their production in plant *in vitro* cultures. *Planta*. 2017 Jul;246(1):19-32.
- Sarkar, F.H., Rahman, K.M., Li, Y. Bax translocation to mitochondria is an important event in inducing apoptotic cell death by indole-3-carbinol (I3C) treatment of breast cancer cells. *J. Nutr*. 2003. 133(7 Suppl): 2434S-9S.
- Sarkar, R., Mukherjee, S., Biswas., Roy, M. Sulphoraphane, a naturally occurring isothiocyanate induces apoptosis in breast cancer cells by targeting heat shock proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2012.427(1): 80-85.

- Sarkars, R., Mukherjee, S., Roy, M. Targeting heat shock proteins by phenethyl isothiocyanate results in cell-cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells. *Nutr. Cancer*. 2013. 65(3): 480-93.
- Sasaki, M;Tanaka, Y; Perinchery, G; Dharia, A; Kotcherguina, I; Fujimoto, Si et al., Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2002, 94, 384-90.
- Saunus, J.M.; Smart, C.E.; Kutasovic, J.R. et al., Multidimensional phenotyping of breast cancer cell lines to guide preclinical research. *Breast Cancer Res Treat*. 2018. 167: 289–301.
- Sayed, M.A., Bracci, M., Ciarapica, V., Malavolta, M., Provinciali, M., Pieragostini, E., Gaetani, S., Monaco, F., Lucarini, G., Rapisarda, V., Di Primio, R., Santarelli, L. Allyl Isothiocyanate Exhibits No Anticancer Activity in MDA-MB-231 *Breast Cancer Cells*. *Int J Mol Sci*.2018. 19(1):145.
- Scheel, C., Weinberg, R.A. Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition: Concepts and molecular links. *Semin. Cancer Biol*. 2012.22(5-6): 396-403.
- Sehrawat, A., Kim, S.H., Vogt, A., Singh, S.V. Suppression of FOXQ1 in benzyl isothiocyanate-mediated inhibition of epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2013.34(4): 864-873.
- Sehrawat, A., Singh, S.V. Benzyl isothiocyanate inhibits epithelial-mesenchymal transition in cultured and xenografted human breast cancer cells. *Cancer Prev. Res*.2011. 4: 1107–17.
- Sehrawat, A., Singh, S.V. Short-form RON overexpression augments benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Mol. Carcinog*.2016. 55(5): 473-85.
- Seim, I.; Jeffery, P.L.; Thomas, P.B.; Nelson, C.C.; Chopin, LK. Whole-Genome Sequence of the Metastatic PC3 and

- LNCaP Human Prostate Cancer Cell Lines. *G3 (Bethesda)*. 2017;7: 1731-141.
- Seligson DB, Hongo F, Huerta-Yepez S, Mizutani Y, Miki T, Yu H, Horvath S, Chia D, Goodglick L, Bonavida B. Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein is a strong predictor of human prostate cancer recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007 Oct 15; 13(20):6056-63.
- SEOM. (Sociedad Española de Oncología Médica) Las cifras del cáncer en España. Madrid, 2021.[Monografía en Internet] [acceso 1/4/2021] Disponible en: [https://seom.org/images/Cifras\\_del\\_cancer\\_en\\_Espnaha\\_2021.pdf](https://seom.org/images/Cifras_del_cancer_en_Espnaha_2021.pdf)
- Shamloo, B.; Usluer, S. p21 in cancer research. *Cancers*. 2019. 11: 1178.
- Shankar S, Ganapathy S, Srivastava RK. Sulforaphane enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer orthotopic model through regulation of apoptosis, metastasis, and angiogenesis. *Clin Cancer Res*. 2008 Nov 1; 14(21):6855-66.
- Sharma P, López-Tarruella S, García-Saenz JA, Khan QJ, Gómez HL, Prat A, Moreno F, Jerez-Gilarranz Y, Barnadas A, Picornell AC, Monte-Millán MD, González-Rivera M, Massarrah T, Pelaez-Lorenzo B, Palomero MI, González Del Val R, Cortés J, Fuentes-Rivera H, Morales DB, Márquez-Rodas I, Perou CM, Lehn C, Wang YY, Klemp JR, Mammen JV, Wagner JL, Amin AL, O'Dea AP, Heldstab J, Jensen RA, Kimler BF, Godwin AK, Martín M. Pathological Response and Survival in Triple-Negative Breast Cancer Following Neoadjuvant Carboplatin plus Docetaxel. *Clin Cancer Res*. 2018 Dec 1;24(23):5820-5829.
- Sharpe B, Beresford M, Bowen R, Mitchard J, Chalmers AD. Searching for prostate cancer stem cells: markers and methods. *Stem Cell Rev Rep*. 2013 Oct; 9(5):721-30.



- Shim JS, Liu JO. Recent advances in drug repositioning for the discovery of new anticancer drugs. *Int J Biol Sciences*. 2014; 10 (7): 654-63.
- Singh A.V., Xiao D., Lew K.L., Dhir R., Singh S.V. Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC3 human prostate cancer cells and retards growth of PC3 xenografts *in vivo*. *Carcinogenesis*. 2004;25:83–90.
- Singh R, Letai A & Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019. 20: 175–93.
- Singh S.V., Warin R., Xiao D., Powolny A.A., Stan S.D., Arlotti J.A., Zeng Y., Hahm E.R., Marynowski S.W., Bommarreddy A., et al., Sulforaphane inhibits prostate carcinogenesis and pulmonary metastasis in TRAMP mice in association with increased cytotoxicity of natural killer cells. *Cancer Res*. 2009;69:2117–25.
- Singh SV, Herman-Antosiewicz A, Singh AV, Lew KL, Srivastava SK, Kamath R, Brown KD, Zhang L, Baskaran R. Sulforaphane-induced G2/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25C.. *J Biol Chem*. 2004 Jun 11; 279(24):25813-22.
- Singh, S.V., Kim, S.H., Sehrawat, A., Arlotti, J.A., Hahm, E.R., Sakao, K., Beumer, J.H., Jankowitz, R.C., Chandra-Kuntal, K., Lee, J., Powolny, A.A., Dhir, R. Biomarkers of phenethyl isothiocyanate-mediated mammary cancer chemoprevention in a clinically relevant mouse model. *J. Natl. Cancer Inst*. 2012.104(16): 1228-1239.
- Sinn, H. P., & Kreipe, H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast care (Basel, Switzerland)*.2013. 8(2): 149–54.
- Sociedad Española de Oncología Quirúrgica.SEOQ. Protocolo de cancer de mama. Unidad de patología mamaria. Hospital Univesitario Ramón y Cajal. 2013. Disponible en: [https://seoq.org/docs/protocolo\\_cancer\\_mama\\_huryc.pdf](https://seoq.org/docs/protocolo_cancer_mama_huryc.pdf)

- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M: A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51: 1409-16.
- Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018. Jul 12; 379(2):111-21.
- Stanton, R.A.; Gernert, K.M.; Nettles, J.H.; Aneja, R. Drugs that target dynamic microtubules: A new molecular perspective. *Med Res Rev.* 2011. 31: 443–81.
- Sweeney, E.E.; McDaniel, R.E.; Maximov, P.Y.; Fan, P.; Jordan, V.C. Models and Mechanisms of Acquired Antihormone Resistance in Breast Cancer: Significant Clinical Progress Despite Limitations. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2012, 9,143-63.
- Syed Alwi, S.S., Cavell, B.E., Donlevy, A., Packham, G.) Differential induction of apoptosis in human breast cancer cell lines by phenethyl isothiocyanate, a glutathione depleting agent. *Cell Stress Chaperones.* 2012. 17(5): 529-38.
- Syed Alwi, S.S., Cavell, B.E., Telang, U., Morris, M.E., Parry, B.M., Packham, G. *In vivo* modulation of 4E binding protein 1 (4E-BP1) phosphorylation by watercress: a pilot study. *Br. J. Nutr.* 2010. 104(9): 1288-96.
- Tai S, Sun Y, Squires JM, Zhang H, Oh WK, Liang CZ, Huang J. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate.* 2011 Nov;71(15):1668-79.
- Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, Lazar AJ, Morris EA, Sahin A, Salgado R, Sapino A, Sasano H, Schnitt S, Sotiriou C, van Diest P, White VA, Lokuhetty D, Cree IA; WHO Classification of Tumours Editorial Board. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology.*2020 Aug;77(2):181-85.
- Tang NY, Huang YT, Yu CS, Ko YC, Wu SH, Ji BC, Yang JS, Yang JL, Hsia TC, Chen YY, Chung JG. Phenethyl

- isothiocyanate (PEITC) promotes G2/M phase arrest via p53 expression and induces apoptosis through caspase- and mitochondria-dependent signaling pathways in human prostate cancer DU 145 cells. *Anticancer Res.* 2011 May; 31(5):1691-702.
- Taylor, R., Cullen, S. & Martin, S. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 231–41.
- The Broad Institute Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE), 2021. The Broad Institute of MIT&Harvard. Archived URL: <http://www.broadinstitute.org/ccle/home>.
- Theodoratou E, Timofeeva M, Li X, Meng X, Ioannidis JPA. Nature, Nurture, and Cancer Risks: Genetic and Nutritional Contributions to Cancer. *Annu Rev Nutr.* 2017. 21:293–320.
- Tiwari, R.K., Guo, L., Bradlow, H.L., Telang, N.T., Osborne, M.P. Selective responsiveness of human breast cancer cells to indole-3-carbinol, a chemopreventive agent. *J. Natl. Cancer Inst.* 1994.86(2): 126-31.
- Tolkach Y, Kristiansen G. The Heterogeneity of Prostate Cancer: A Practical Approach. *Pathobiology.* 2018;85(1-2):108-16.
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science.* 2005 Oct 28; 310(5748):644-8.
- Toner AP, McLaughlin F, Giles FJ, Sullivan FJ, O'Connell E, Carleton LA, Breen L, Dunne G, Gorman AM, Lewis JD and Glynn SA: The novel toluidine sulphonamide EL102 shows preclinical in vitro and in vivo activity against prostate cancer and circumvents MDR1 resistance. *Br J Cancer.* 2013. 109: 2131-41.
- Tonyali, S.; Haberal, H.B.; Sogutdelen, E. Toxicity, adverse events, and quality of life associated with the treatment

- of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Curr Urol.* 2017;10:169–73.
- Toss A, Cristofanilli M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2015; 17(1): 60.
- Traka MH, Melchini A, Mithen RF. Sulforaphane and prostate cancer interception. *Drug Discov Today.* 2014 Sep; 19(9):1488-92.
- Tsai, S.C., Huang, W.W., Huang, W.C., Lu, C.C., Chiang, J.H., Peng, S.F., Chung, J.G., Lin, Y.H., Hsu, Y.M., Amagaya, S., Yang, J.S. ERK-modulated intrinsic signaling and G(2)/M phase arrest contribute to the induction of apoptotic death by allyl isothiocyanate in MDA-MB-468 human breast adenocarcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 2012;41(6): 2065-72.
- Tse G, Eslick GD. Cruciferous vegetables and risk of colorectal neoplasms: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Cancer.* 2014;66(1):128-39.
- Tseng, E.; Kamath, A.; Morris, M.E. Effect of organic isothiocyanates on the P-glycoprotein- and MRP1-mediated transport of daunomycin and vinblastine. *Pharm. Res.* 2002. 19: 1509–15.
- van Eijk M, Boosman RJ, Schinkel AH, Huitema ADR, Beijnen JH. Cytochrome P450 3A4, 3A5, and 2C8 expression in breast, prostate, lung, endometrial, and ovarian tumors: relevance for resistance to taxanes. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2019 Sep;84(3):487-99.
- Velie EM1, Schairer C, Flood A, He JP, Khattree R, Schatzkin A. Empirically derived dietary patterns and risk of postmenopausal breast cancer in a large prospective cohort study. 2005 Dec. *Am J Clin Nutr.* 82(6):1308-19.
- Venema CM, Bense RD, Steenbruggen TG, Nienhuis HH, Qiu SQ, van Kruchten M, Brown M, Tamimi RM, Hoppers GAP, Schröder CP, Fehrmann RSN, de Vries EGE. Consideration of breast cancer subtype in targeting the

- androgen receptor. *Pharmacol Ther.* 2019 Aug;200:135-47.
- Vera-Ramirez, L., Vodnala, S.K., Nini, R., Hunter, K.W., Green, J.E. Autophagy promotes the survival of dormant breast cancer cells and metastatic tumour recurrence. *Nature Communications* volume 9, Article number: 1944. *Nat Commun.* 2018.9(1): 1944.
- Vue, B., Zhang, S., Chen QH. Synergistic Effects of Dietary Natural Products as Anti-Prostate Cancer Agents. *Nat Prod Commun.* 2015 Dec;10(12):2179-88.
- Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res.* 1995. Nov 15;55(22):5187-90.
- Wang C, Huang SB, Yang MC, Lin YT, Chu IH, Shen YN, Chiu YH, Hung SH, Kang L, Hong YR, Chen CH. Combining paclitaxel with ABT-263 has a synergistic effect on paclitaxel resistant prostate cancer cells. *PLoS One.* 2015 Mar 26;10(3):e0120913.
- Wang L, Liu D, Ahmed T, Chung FL, Conaway C, Chiao JW. Targeting cell cycle machinery as a molecular mechanism of sulforaphane in prostate cancer prevention. *Int J Oncol.* 2004 Jan; 24(1):187-92.
- Wang LG, Beklemisheva A, Liu XM, Ferrari AC, Feng J, Chiao JW. Dual action on promoter demethylation and chromatin by an isothiocyanate restored GSTP1 silenced in prostate cancer. *Mol Carcinog.* 2007 Jan; 46(1):24-31.
- Wang LG, Chiao JW. Prostate cancer chemopreventive activity of phenethyl isothiocyanate through epigenetic regulation (review). *Int J Oncol.* 2010 Sep; 37(3):533-9.
- Wang LG, Liu XM, Chiao JW. Repression of androgen receptor in prostate cancer cells by phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis.* 2006 Oct; 27(10):2124-32.
- Wang LG, Liu XM, Fang Y, Dai W, Chiao FB, Puccio GM, Feng J, Liu D, Chiao JW. De-repression of the p21 promoter in prostate cancer cells by an isothiocyanate via

- inhibition of HDACs and c-Myc. *Int J Oncol.* 2008 Aug; 33(2):375-80.
- Wang, P.; Henning, SM.; Heber, D.; Vadgama, J.V. Sensitization to docetaxel in prostate cancer cells by green tea and quercetin. *J Nutr Biochem.* 2015. 26:408-15.
- Warin, R., Xiao, D., Arlotti, J.A., Bommareddy, A., Singh, S.V. Inhibition of human breast cancer xenograft growth by cruciferous vegetable constituent benzyl isothiocyanate. *Mol. Carcinog.* 2010.49(5): 500-07.
- Watson PA, Arora VK, Sawyers CL. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015 Dec; 15(12):701-11.
- Wattenberg, LW. (1966) Chemoprophylaxis of carcinogenesis: a review. *Cancer Res.* 26(7):1520-26.
- Westphal, D.; Dewson, G.; Czabotar, P.E.; Kluck, R.M. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys. Acta.* 2011, 1813, 521–31
- Westphal, D.; Kluck, R.; Dewson, G. Building blocks of the apoptotic pore: How Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death Differ.* 2014. 21:196–205.
- WHO. IARC WHO Classification of Tumours. [Internet][acceso 2021][actualización 2021]. Disponible en: <https://whobluebooks.iarc.fr/>.
- Wiebe, J.P; Lewis, M.J. Activity and expression of progesterone metabolizing 5alpha-reductase, 20alpha-hydroxysteroid oxidoreductase and 3alpha(beta)-hydroxysteroid oxidoreductases in tumorigenic (MCF7, MDA-MB-231, T-47D) and nontumorigenic (MCF-10A) human breast cancer cells.. *BMC Cancer.* 2003. 22: 3:9.
- Wong CP, Hsu A, Buchanan A, Palomera-Sanchez Z, Beaver LM, Houseman EA, Williams DE, Dashwood RH, Ho E. Effects of sulforaphane and 3,3'-diindolylmethane on genome-wide promoter methylation in normal prostate

epithelial cells and prostate cancer cells. *PLoS One*. 2014; 9(1):e86787.

- Woodson K, Gillespie J, Hanson J, Emmert-Buck M, Phillips JM, Linehan WM, Tangrea JA. Heterogeneous gene methylation patterns among pre-invasive and cancerous lesions of the prostate: a histopathologic study of whole mount prostate specimens. *Prostate*. 2004 Jun 15; 60(1):25-31.
- Wu, Y., Feng, X., Jin, Y., Wu, Z., Hankey, W., Paisie., Li, L., Liu, F., Barsky, S.H., Zhang, W., Ganju, R., Zou, X. (2010) A novel mechanism of indole-3-carbinol effects on breast carcinogenesis involves induction of Cdc25A degradation. *Cancer Prev. Res.*, 3(7): 818-28.
- Xiao D, Johnson CS, Trump DL, Singh SV. Proteasome-mediated degradation of cell division cycle 25C and cyclin-dependent kinase 1 in phenethyl isothiocyanate-induced G2-M-phase cell cycle arrest in PC3 human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2004 May; 3(5):567-75.
- Xiao D, Powolny AA, Moura MB, Kelley EE, Bommareddy A, Kim SH, Hahm ER, Normolle D, Van Houten B, Singh SV. Phenethyl isothiocyanate inhibits oxidative phosphorylation to trigger reactive oxygen species-mediated death of human prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2010 Aug 20; 285(34):26558-69.
- Xiao D, Singh SV. Phenethyl isothiocyanate sensitizes androgen-independent human prostate cancer cells to docetaxel-induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Pharm Res*. 2010 Apr; 27(4):722-31.
- Xiao D, Srivastava SK, Lew KL, Zeng Y, Hershberger P, Johnson CS, Trump DL, Singh SV. Allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables, inhibits proliferation of human prostate cancer cells by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Carcinogenesis*. 2003 May; 24(5):891-7.



- Xiao D, Vogel V & Singh SV. Benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in human breast cancer cells is initiated by reactive oxygen species and regulated by Bax and Bak. *Molecular Cancer Therapeutics* 2006; 5(11): 2931-45.
- Xiao D., Lew K.L., Zeng Y., Xiao H., Marynowski S.W., Dhir R., Singh S.V. Phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis in PC3 human prostate cancer cells is mediated by reactive oxygen species-dependent disruption of the mitochondrial membrane potential. *Carcinogenesis*. 2006;27:2223–34
- Xiao, D., Bommareddy, A., Kim, S.H., Sehrawat, A., Hahm, E.R., Singh, S.V. Benzyl isothiocyanate causes FoxO1-mediated autophagic death in human breast cancer cells. *PLoS One*.2012. 7(3):e32597.
- Xiao, D., Powolny, A.A., Singh, S.V. Benzyl isothiocyanate targets mitochondrial respiratory chain to trigger reactive oxygen species-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2008. 283(44): 30151-63.
- Xiaofeng Dai, Hongye Cheng, Zhonghu Bai, Jia Li. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Cancer* 2017. 8(16):3131-41.
- Yiannakopoulou, E.C. Interaction of green tea catechins with breast cancer endocrine treatment: a systematic review. *Pharmacology*. 2014. 94:245-48.
- Yu S, Kim T, Yoo HK, Kang K. The T47D Cell Line Is an Ideal Experimental Model to Elucidate the Progesterone-Specific Effects of a Luminal A Subtype of Breast Cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017. 6; 486(3):752-58.
- Zhang Q, Chen M, Cao L, Ren Y, Guo X, Wu X, Xu K. Phenethyl isothiocyanate synergistically induces apoptosis with Gefitinib in non-small cell lung cancer cells via endoplasmic reticulum stress-mediated degradation of Mcl-1. *Mol Carcinog*. 2020 Jun;59(6):590-603.



- Zhang, Y. The molecular basis that unifies the metabolism, cellular uptake and chemopreventive activities of dietary isothiocyanates. *Carcinogenesis*. 2012. 33:2–9
- Zhang, Z., Atwell, L.L., Farris, P.E., Ho, E., & Shannon, J. Associations between cruciferous vegetable intake and selected biomarkers among women scheduled for breast biopsies. *Public Health Nutr.* 2016. 19(7): 1288-95.
- Zou Y, Fineberg S, Pearlman A, Feinman RD, Fine EJ. The effect of a ketogenic diet and synergy with rapamycin in a mouse model of breast cancer. *PLoS One*. 2020 Dec 3;15(12):e0233662.



## **9. ANEXOS**





Article

# Glucosinolate-Degradation Products as Co-Adjuvant Therapy on Prostate Cancer in Vitro

María Jesús Núñez-Iglesias <sup>1,\*</sup>, Silvia Novío <sup>1,\*</sup>, Carlota García <sup>1</sup>, Elena Pérez-Muñuzuri <sup>1</sup>,  
Pilar Soengas <sup>2</sup>, Elena Cartea <sup>2</sup> , Pablo Velasco <sup>2</sup> and Manuel Freire-Garabal <sup>1</sup>

<sup>1</sup> SNL Laboratory, School of Medicine and Dentistry, University of Santiago de Compostela, c/San Francisco, s/n, 15782 Santiago de Compostela, A Coruña, Spain; carlota.garcia@rai.usc.es (C.G.); mariaelena.perez@usc.es (E.P.-M.); manuel.freire-garabal@usc.es (M.F.-G.)

<sup>2</sup> Group of Genetics, Breeding and Biochemistry of Brassicas, Misión Biológica de Galicia (CSIC) Aptdo. 28, 36080 Pontevedra, Spain; psoengas@mbg.csic.es (P.S.); ecartea@mbg.csic.es (E.C.); pvelasco@mbg.csic.es (P.V.)

\* Correspondence: mjesus.nunez@usc.es (M.J.N.-I.); silvia.novio@usc.es (S.N.); Tel.: +34-881812374 (S.N.)

Received: 9 September 2019; Accepted: 8 October 2019; Published: 9 October 2019



**Abstract:** Glucosinolate-degradation products (GS-degradation products) are believed to be responsible for the anticancer effects of cruciferous vegetables. Furthermore, they could improve the efficacy and reduce side-effects of chemotherapy. The aim of the present study was to determine the cytotoxic effects of GS-degradation products on androgen-insensitive human prostate cancer (AIPC) PC-3 and DU 145 cells and investigate their ability to sensitize such cells to chemotherapeutic drug Docetaxel (DOCE). Cells were cultured under growing concentrations of allyl-isothiocyanate (AITC), sulforaphane (SFN), 4-pentenyl-isothiocyanate (4PI), iberin (IB), indole-3-carbinol (I3C), or phenethyl-isothiocyanate (PEITC) in absence or presence of DOCE. The anti-tumor effects of these compounds were analyzed using the trypan blue exclusion, apoptosis, invasion and RT-qPCR assays and confocal microscopy. We observed that AITC, SFN, IB, and/or PEITC induced a dose- and time-dependent cytotoxic effect on PC-3 and DU 145 cells, which was mediated, at least, by apoptosis and cell cycle arrest. Likewise, we showed that these GS-degradation products sensitized both cell lines to DOCE by synergic mechanisms. Taken together, our results indicate that GS-degradation products can be promising compounds as co-adjuvant therapy in prostate cancer.

**Keywords:** chemoprevention; docetaxel; drug-sensitization; isothiocyanates; prostate cancer; synergism

## 1. Introduction

Prostate cancer (PC) remains the most commonly diagnosed malignancy for men and the second leading cause of cancer-related deaths for men due to its ability to metastasize [1]. Currently, taxane drugs such as docetaxel (DOCE), are indicated for both the treatment of recurrent hormone-sensitive PC in combination with androgen deprivation therapy (ADT) and treatment of castration-resistant prostate cancer (CRPC) [2]. However, since taxanes have limited effectiveness as well as high toxicity [3,4], there is an urgent need for new treatment strategies in order to try to solve these drawbacks.

Over the past several decades, bioactive constituents of plants such as vegetables of the family Brassicaceae (also called Cruciferae), have gained considerable appreciation [5]. The cruciferous family includes many vegetables that are found in this diet (see Table 1) and whose consumption is beneficial at least by their anticancer effects [6,7]. Recently, it is known that such effects are attributed to glucosinolates (GSs), and more specifically to their degradation products (GS-degradation products): isothiocyanates (ITCs), for example: sulforaphane (SFN), allyl-isothiocyanate (AITC),

phenethyl-isothiocyanate (PEITC), iberin (IB), 4-pentenyl-isothiocyanate (4PI)), indoles (for example indole-3-carbinol (I3C)), nitriles, and epithionitriles [7]. Thus ITCs, the most studied GS-degradation products, have been shown to reduce the growth of PCs by regulating target enzymes, controlling apoptosis, inhibiting cell migration and angiogenesis, or blocking the cell cycle [8]. However, the ability of GS-degradation products to reduce dose-limiting toxicity of chemotherapeutic drugs, to increase their efficacy and/or reverse the insensitivity of cancer cells to them has been scarcely studied [9,10].

**Table 1.** Glucosinolates (GSs) in vegetable and salad crops of Brassicaceae family.

Common Name	Scientific Name	Main GSs	GSs Type
Broccoli var.	<i>Brassica oleracea</i>	Glucoraphanin, Sinigrin, Glucobrassicin	Aliphatic and indolic
	<i>italica</i>		
Cauliflower	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Sinigrin, Glucoraphanin, Glucoiberin, Glucobrassicin	Aliphatic and indolic
Brussels sprouts	<i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	Sinigrin, Progoitrin, Glucoraphanin, Glucoiberin, Glucobrassicin	Aliphatic and indolic
Cabbage	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Sinigrin, Glucoiberin, Progoitrin, Glucobrassicin	Aliphatic and indolic
Kale	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	Sinigrin, Glucoiberin, Glucobrassicin	Aliphatic and indolic
Chinese cabbage	<i>B. oleracea</i> var. <i>pekinensis</i>	Sinigrin, Progoitrin, Glucobrassicin	Aliphatic and indolic
Kohlrabi	<i>B. oleracea</i> var. <i>gongylodes</i>	Gluconapin, Glucoerucin, Glucoraphanin, Glucobrassicin	Aliphatic and indolic
Turnip	<i>Brassica rapa</i>	Gluconapin, Glucobrassicin	Aliphatic
Rutabaga	<i>Brassica napus</i> var. <i>napobrassica</i>	Sinigrin, Gluconapin, Progoitrin, Glucoerucin, Gluconasturtiin	Aliphatic and aromatic
Nabicol	<i>B. napus</i> var. <i>pabularia</i>	Gluconasturtiin, Progoitrin, Glucobrassicin	Aliphatic
Mustard black	<i>Brassica nigra</i>	Sinigrin, Gluconapin, Gluconasturtiin	Aliphatic
Mustard brown	<i>Brassica juncea</i>	Sinigrin, Progoitrin, Gluconapin, Glucobrassicin	Aliphatic
Mustard white	<i>Sinapis alba</i>	Gluconasturtiin, Glucosinabin	Aliphatic
Garden cress	<i>Lepidium sativum</i>	Glucotropaeolin	Aromatic
Watercress	<i>Nasturtium officinale</i>	Glucoiberin, Glucobrassicin, Gluconasturtiin	Aliphatic, indolic and aromatic
Rocket	<i>Eruca sativa</i> <i>Diplotaxis</i> sp.	Glucoerucin, Glucoraphanin	Aliphatic
Radish	<i>Raphanus sativa</i>	Sinigrin, Glucoerucin, Glucotropaeolin, Gluconasturtiin, Glucobrassicin	Aliphatic, indolic and aromatic
Horseradish	<i>Armoracia lapathifolia</i>	Sinigrin, Gluconapin, Gluconasturtiin	Aliphatic and aromatic

The GSs consist of a  $\beta$ -thioglucose moiety, a sulfonated oxime moiety, and a variable side chain derived from an amino acid. Based on their amino acid precursors, GSs are classified into three major groups: aliphatic, aromatic, and indolic GSs.

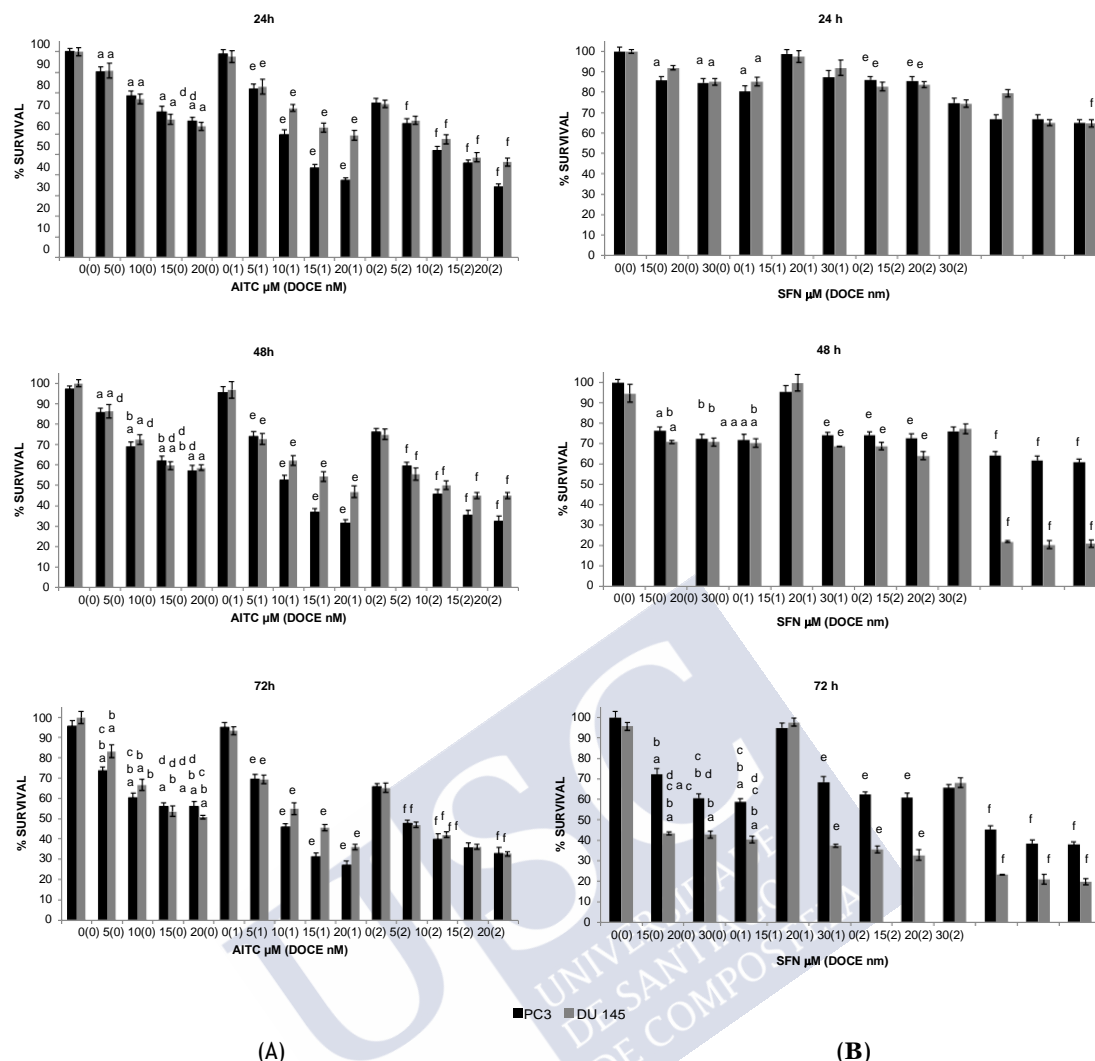
The aim of this study was to examine in vitro anti-cancer effects of six GS-degradation products (SFN, AITC, PEITC, 4PI, IB, and I3C) in two cell lines of PC, in the absence or presence of the chemotherapeutic drug DOCE, using primary cultures of healthy human prostate epithelial cells (PEC) and the androgen-insensitive human prostate cancer (AIPC) cell lines PC-3 and DU 145. We have observed that ITCs could be effective as co-adjutant therapy of DOCE, this suggests that cruciferous vegetables could be recommended together with classical chemotherapy agents in patients with CRPC.

## 2. Results

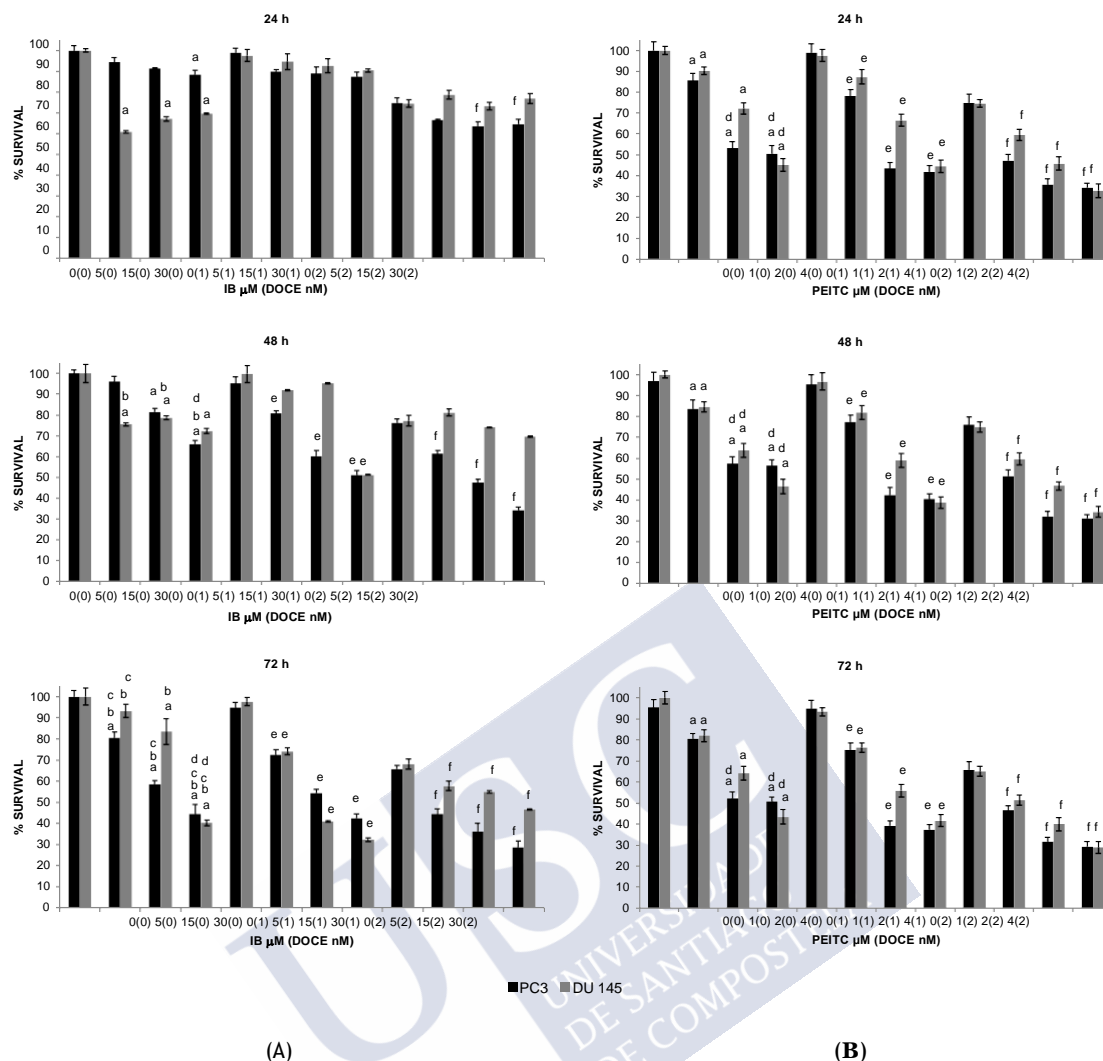
### 2.1. Inhibition of PC Cells Proliferation by GS Degradation-Products and/or DOCE

The doses of GS degradation-products were chosen according to the toxicity levels on PEC cells. Doses up to 20  $\mu$ M of AITC, 4  $\mu$ M of PEITC, 500  $\mu$ M of 4PI, 30  $\mu$ M of SFN, 30  $\mu$ M of IB, and 400  $\mu$ M of I3C decreased survival drastically (differences  $p < 0.05$ ).

All the GS degradation-products tested, except I3C and 4PI, reduced the survival of PC-3 and DU 145 cells. AITC, SFN, and IB inhibited the survival of both cell lines in a concentration- and time-dependent manner (Figures 1 and 2A), whereas PEITC inhibited their survival only in a concentration-dependent manner (Figure 2B).



**Figure 1.** Time-course and dose-response of allyl-isothiocyanate (A) and sulforaphane (B) treatment effects on proliferation of PC-3 (black pillar) and DU 145 (grey pillar) cells as determined by trypan blue dye exclusion assay. Prostate cancer cells were plated, allowed to attach overnight, and treated with dimethyl sulfoxide (DMSO) (control) or desired concentration of allyl-isothiocyanate (AITC) or sulforaphane (SFN) and/or DOCE (docetaxel) for specified time intervals. Both floating and adherent cells were collected and used for counting of dead and live cells. Data are shown as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. <sup>a</sup>,  $p < 0.05$ , ITC treatment alone significantly different compared with control treatment; <sup>b</sup>,  $p < 0.05$ , ITC treatment alone for 48 or 72 h significantly different compared with ITC treatment alone for 24 h; <sup>c</sup>,  $p < 0.05$ , ITC treatment alone for 72 h significantly different compared with ITC treatment alone for 48 h; <sup>d</sup>,  $p < 0.05$ , ITC treatment alone significantly different compared with 2 nM DOCE alone; <sup>e</sup>,  $p < 0.05$ , combination treatment (ITC + DOCE 1 nM) significantly different compared with 1 nM DOCE alone; <sup>f</sup>,  $p < 0.05$ , combination treatment (ITC + DOCE 2 nM) significantly different compared with 2 nM DOCE alone (one-way ANOVA).



**Figure 2.** Time-course and dose-response of iberin (A) and phenethyl-isothiocyanate (B) treatment effects on proliferation of PC-3 (black pillar) and DU 145 (grey pillar) cells as determined by trypan blue dye exclusion assay. Prostate cancer cells were plated, allowed to attach overnight, and treated with DMSO (control) or desired concentration of iberin (IB), phenethyl-isothiocyanate (PEITC) and/or docetaxel (DOCE) for specified time intervals. Both floating and adherent cells were collected and used for counting of dead and live cells. Data are shown as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. <sup>a</sup>,  $p < 0.05$ , ITC treatment alone significantly different compared with control treatment; <sup>b</sup>,  $p < 0.05$ , ITC treatment alone for 48 or 72 h significantly different compared with ITC treatment alone for 24 h; <sup>c</sup>,  $p < 0.05$ , ITC treatment alone for 72 h significantly different compared with ITC treatment alone for 48 h; <sup>d</sup>,  $p < 0.05$ , ITC treatment alone significantly different compared with 2 nM DOCE alone; <sup>e</sup>,  $p < 0.05$ , combination treatment (ITC + DOCE 1nM) significantly different compared with 1 nM DOCE alone; <sup>f</sup>,  $p < 0.05$ , combination treatment (ITC + DOCE 2nM) significantly different compared with 2 nM DOCE alone (one-way ANOVA).

The inhibitory effect induced by AITC was similar for both cell lines (Figure 1A), however the other compounds (Figures 1B and 2) exhibited cell-specific effects or had a higher inhibitory effect on one of the cell lines. For example, the inhibition induced by the SFN treatment was more pronounced on DU 145 cells (57–60%) than on PC-3 cells (28–42%) at 72 h (Figure 1B).

All the GS degradation-products tested (Figures 1 and 2), except SFN on PC-3 cells (Figure 1B), were more effective on PC-3 and DU 145 cells than DOCE. For example, at the maximum dose tested: 20  $\mu$ M of AITC (Figure 1A) at 24, 48, and 72 h reduced PC-3 and DU 145 viability by ~35%, ~40%, and ~48%; 4  $\mu$ M of PEITC (Figure 2B) at 24, 48, and 72 h reduced PC-3 and DU 145 cell viability by ~49%

and ~55%, ~44% and ~54%, and ~49 and ~57% whereas that 2 nM DOCE alone inhibited the growth of these cells by ~25%, ~24%, and ~34%, respectively.

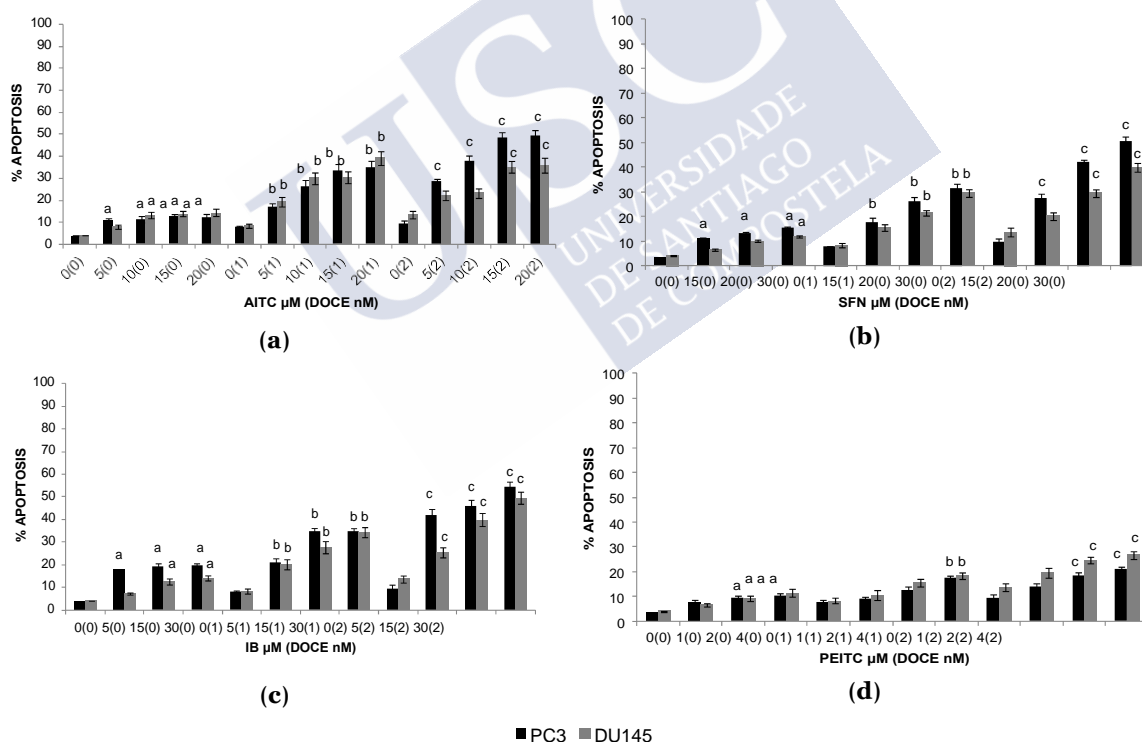
## 2.2. Sensitization of PC Cells to Growth Suppression by DOCE

The combination therapy with ITCs and DOCE was significantly more **efficacious** against viability of PC cells compared with ITCs or DOCE treatment alone. This **effect** was observed for both cell lines tested, so the ITC-mediated sensitization to growth suppression by DOCE was not a cell line-specific response. Analyzing results by the method previously described [11], in general, it was observed that the enhancement of anti-proliferative activity of DOCE mediated by ITC on PC-3 and DU 145 cells can be explained by synergic mechanisms (expected survival rate/observed survival rate  $>1$ ) (Tables A1–A8); only no synergistic **effect** was observed for SFN on PC-3 cells at 24 h and 48 h and on DU 145 cells at 24 h (Tables A3 and A4), and for IB on DU 145 cells at 24 and 48 h (Table A6).

## 2.3. Apoptosis

Apoptotic **effects** were only studied for those compounds which had had some **effect** on the viability of PC cells, i.e., AITC, SFN, IB, and PEITC.

AITC-, IB-, SFN-, and PEITC-mediated death of PC-3 and DU 145 cells can be explained by apoptotic mechanisms (19.7% and 14.09%, 15.32% and 11.83%, 12.3% and 14.43%, and 10.31% and 11.39% of apoptotic cells with the highest dose of IB, SFN, AITC, and PEITC, for PC-3 and DU 145 cells, respectively). When these cell lines were treated with DOCE, the percentages of apoptotic cells were of up to ~9% and ~14% for PC-3 and DU 145 cells, respectively. Combination therapy with ITC increased the **efficacy** of chemotherapeutic drug in both cell lines (Figure 3A).

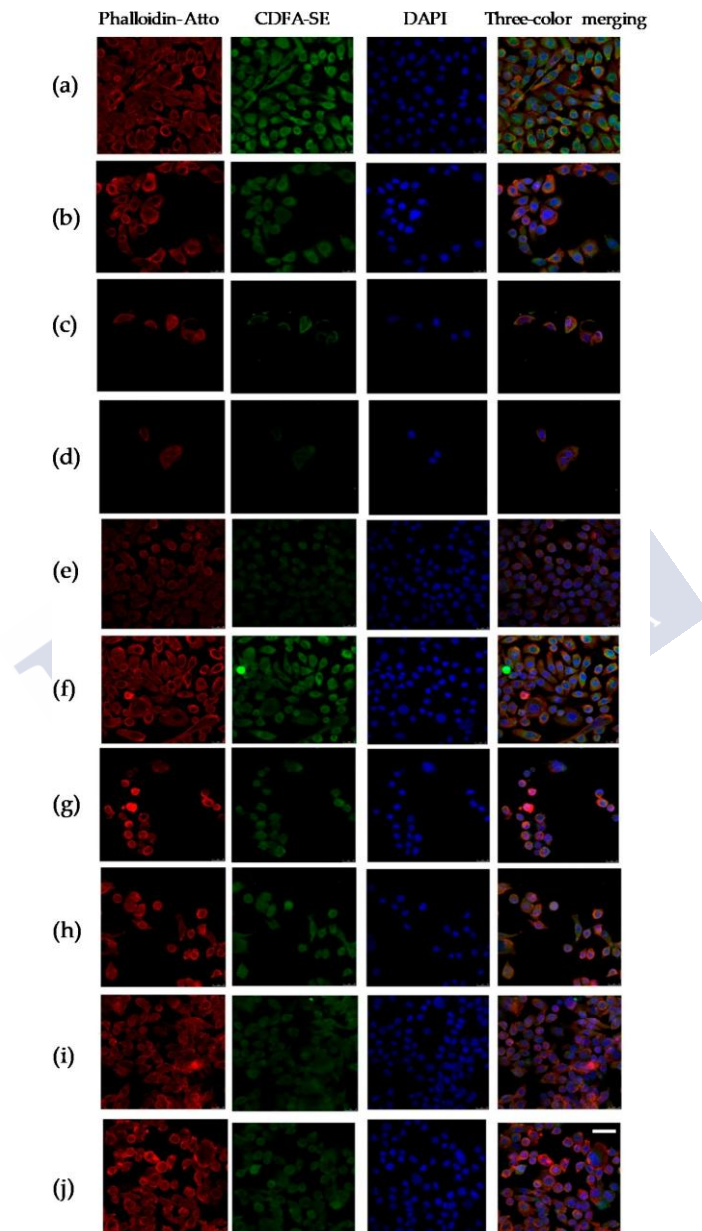


**Figure 3.** Quantitation of apoptotic PC-3 (black pillar) and DU 145 (grey pillar) cells (DAPI assay) following 72 h treatment with allyl-isothiocyanate (AITC) (a), sulforaphane (SFN) (b), iberin (IB) (c), phenethyl-isothiocyanate (PEITC) (d), and/or docetaxel (DOCE). Data are shown as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. <sup>a</sup>,  $p < 0.05$ , ITC (isothiocyanate) treatment alone significantly **different** compared with control treatment; <sup>b</sup>,  $p < 0.05$ , combination treatment (ITC + DOCE 1 nM) significantly **different** compared with low-dose DOCE alone; <sup>c</sup>,  $p < 0.05$ , combination treatment (ITC + DOCE 2 nM) significantly **different** compared with high-dose DOCE alone (one-way ANOVA).



#### 2.4. Cytopathic Changes

To explore the role of AITC, IB, SFN, and PEITC in cell damage in PC cells, we examined cytopathic changes in PC-3 cells. In the control group, PC-3 cells showed elongated morphology, ellipsoid nuclei with euchromatin and heterochromatin, actin filaments localized mainly beneath the plasma membrane and cytoplasm stained homogenously with CFDA-SE. The cells treated with AITC 20  $\mu$ M, IB 30  $\mu$ M, SFN 30  $\mu$ M, PEITC 4  $\mu$ M, and/or DOCE 2 nM showed a rounded shape as the predominant phenotype and actin skeleton reorganization (Figure 4).

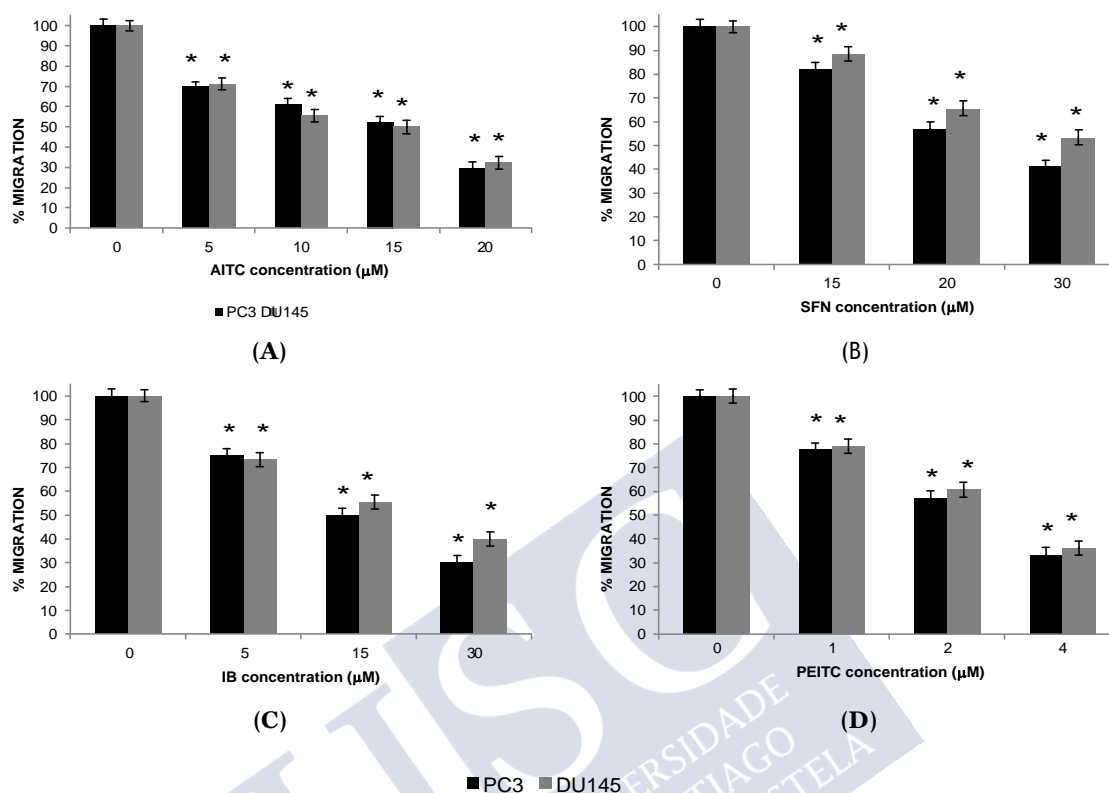


**Figure 4.** Cytopathic changes in PC-3 cells induced by the control treatment (a) or the treatment with DOCE 2 nM (b); AITC 20  $\mu$ M (c); AITC 20  $\mu$ M + DOCE 2 nM (d); SFN 30  $\mu$ M (e); SFN 30  $\mu$ M + DOCE 2 nM (f); IB 30  $\mu$ M (g); IB 30  $\mu$ M + DOCE 2 nM (h); PEITC 4  $\mu$ M (i); PEITC 4  $\mu$ M + DOCE 2 nM (j). Confocal images show green (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFDA-SE), red (Phalloidin-Atto 647N), blue (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) and merge of three channels. The cells treated with AITC (20  $\mu$ M), SFN (30  $\mu$ M), IB (30  $\mu$ M), PEITC (4  $\mu$ M) and/or DOCE (2 nM) showed a predominantly rounded shape phenotype with DNA condensation. Scale bar = 100  $\mu$ m.



## 2.5. Migration of PC Cells

The migration ability of PC-3 and DU 145 cells was affected by the treatment with ITCs (Figure 5). After the treatment for 72 h the migration ability of PC-3 and DU 145 cells was decreased.

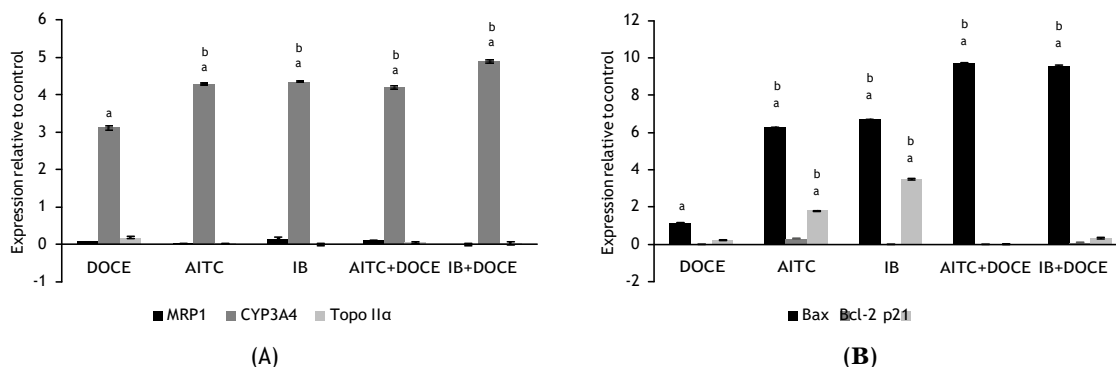


**Figure 5.** Isothiocyanates inhibit PC-3 (black pillar) and DU 145 (grey pillar) cell migration. Prostate cancer cells were treated with allyl-isothiocyanate (AITC), sulforaphane (SFN), iberin (IB), and phenethyl-isothiocyanate (PEITC). Data are shown as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* Isothiocyanate treatment significantly different compared with control treatment ( $p < 0.05$ ).

## 2.6. RT-qPCR

Since AITC and IB were the ITCs that offered the best results as anti-tumor therapy, concretely on PC-3 cells, further studies were focused on this highly metastatic cell line. We verified by RT-qPCR the molecular mechanisms that could be involved in the anti-tumor effects of AITC and IB. The results for the induction drug transporter—(MRP1), drug metabolism—(CYP3A4), target—(DNA topoisomerase II, Topo II $\alpha$ ), migration—(CYP3A4), cell cycle/apoptosis-related (Bax, Bcl2, and p21) genes are shown in Figure 6. Values higher than one were considered positive in comparison to cells treated with control. The cells treated with AITC, IB, DOCE, DOCE-AITC, and DOCE-IB did not show significant induction of MRP1 or Topo II $\alpha$  in relation to control or DOCE. On the contrary, all the treatments significantly increased the expression of CYP3A4 as well as the Bax/Bcl-2 expression ratio in PC-3 cells.

In relation to the p21, its expression was only significantly modified compared to control cells and cells treated with DOCE by the ITCs, AITC, and IB.



**Figure 6.** Effect of allyl-isothiocyanate (AITC), iberin (IB) and/or docetaxel (DOCE) on gene expression ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) of: (A) MRP1, CYP3A4 and Topo II $\alpha$ ; (B) Bax, Bcl-2 and p21. Data are shown as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Values higher than one were considered positive in comparison to cells treated with control. <sup>a</sup> treatment significantly different compared with control ( $p < 0.05$ ). <sup>b</sup> treatment significantly different compared with DOCE ( $p < 0.05$ ).

### 3. Discussion

Recently, there is no satisfactory treatment for PC when the cancer cells lose responsiveness to ADT [12]. DOCE is a therapeutic alternative but with important side effects and limited anti-cancer response, among other aspects due to the appearance of resistance [3,4]. These disadvantages could be addressed by combination therapies. In the present study, we observed that ITCs have very promising anti-cancer efficacy on clinically relevant metastatic prostate cells and that they could be used as co-adjuvant therapy in patients with CRPC.

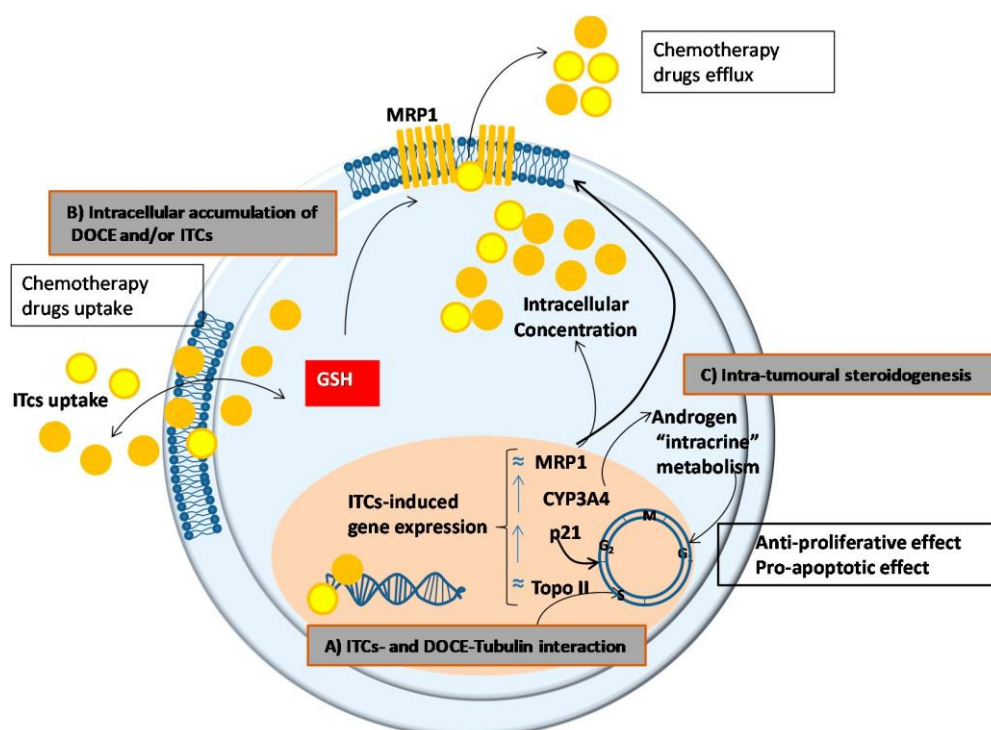
Several ITCs have shown to be potential therapeutic agents for PC since their anti-proliferative [13,14], pro-apoptotic [14,15], and anti-migratory [16,17] effects. Although mechanisms by which they produce these anti-cancer effects are not fully known, their cytotoxic action is usually associated with cell cycle arrest and activation of apoptosis [8,18], as it has been shown in the present study. PC-3 cells treated with AITC and IB increased the expression of p21 and the Bax/Bcl-2 expression ratio, which in turn promotes G1 cell cycle phase arrest [19] and induces the release of cytochrome c causing mitochondrial dysfunction [20]. Collectively, these findings suggest that checkpoints for cell cycle arrest and programmed cell death are regulated by ITCs in PC cells. Therefore, these compounds could play an important role in the management of CRPC.

More interesting than the anti-cancer effect per se of ITCs was their ability to potentiate the action of DOCE. As it has been previously commented, we found that the combination of DOCE with AITC, PEITC, IB or SFN significantly caused a synergistic sensitization of PC-3 and DU 145 for DOCE-induced apoptosis and DOCE-induced cell growth inhibition. The synergistic effect that we observed could be due to (Figure 7):

- A common mechanism of action for ITCs and DOCE at the microtubules. DOCE, a known microtubule-targeting agent, binds to microtubules and causes not only their stabilization but also the inhibition of their depolymerization which exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects, respectively [21]. Likewise, some authors claim that the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of ITCs are due to the degradation and polymerization of  $\alpha$  and  $\beta$  tubulin [22].
- A higher intracellular accumulation of DOCE and/or ITCs, since their efficacy depends on their intracellular accumulation which in turn is determined by the balance between uptake and efflux processes. In this sense, and taking into account that ITCs can inhibit cellular export of anticancer agents [23], we studied the expression of the unidirectional efflux transporter MRP1, which plays a role in the development of drug resistance of various types of cancer [24]. However, the expression of MRP1 was not modified by the treatments tested in the present study.
- A modulation of the intracrine metabolism of androgens mediated CYP3A4. CYP3A4 increases the bioavailability of growth-promoting androgens to PC cells [25], so it has special relevance in clinical

practice. Low levels of expression of CYP3A4 has been associated with poor prognosis in PC patients such as metastasis, high Gleason score, and reduced survival [26]. This mechanism could not explain the anti-proliferative, pro-apoptotic, and anti-migratory effects of AITC or IB on PC-3 cells shown in this study since we used AIPC cells. However, the intra-tumoral steroidogenesis could affect the surrounding tissue and indirectly influence tumour cell behaviour [27]. Concretely, it has been shown that de novo synthesized steroids by cancer cells play an important role in the establishment of metastasis and the induction of castration resistance in PC cells by affecting androgen receptor positive cells in the tumour microenvironment, this is in stroma fibroblasts, smooth muscle cells, endothelial cells, osteoblasts, and inflammatory cells.

- (d) The intracellular level/activity of glutathione (GSH). ITC cell uptake and intracellular accumulation are conditioned by the intracellular levels/activity of GSH, since their uptake occurs via binding with cysteine sulfhydryl groups of GSH [18]. Taking into account that high levels/activity of GSH favour the uptake of ITC [18], the higher cytotoxic effect of SFN on PC-3 cells than on DU 145 cells shown in the present study, could be explained by the higher levels of GSH observed in PC-3 in comparison with DU 145 cells [28].



**Figure 7.** Potential mechanisms to explain the synergistic effect of combined isothiocyanate (ITC, orange circles) and docetaxel (DOCE, yellow circles) in prostate cancer cells. (A) Interaction of ITCs and DOCE with the microtubules. (B) Uptake, accumulation, and efflux of ITCs and DOCE mediated by the expression of efflux transporters and/or glutathione (GSH) levels/activity. (C) Modulation of the intracrine metabolism of androgens. The expression of the genes observed in this study (indicated as  $\approx$  not substantial modification and  $\uparrow$  increase), produces inhibition of proliferative activity and apoptosis. Abbreviations: MRP1. Multidrug resistance-associated protein 1; p21. Cyclin-dependent kinase inhibitor 1; Topo II. DNA topoisomerase 2-alpha.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Cell Culture

Tumorigenic CRPC cell lines PC-3 (CRL-1435) and DU 145 (HTB-81) and healthy PEC (PCAS-440-010) were obtained from ATCC (ATCC; Manassas, VA, USA). PC-3 and DU 145 cell

lines are derived from bone metastasis of human prostate adenocarcinoma grade IV and brain metastasis of prostate carcinoma, respectively. Cells were cultured according to ATCC's instructions with F-12K Medium (cat. no. 30-2004, ATCC) and Prostate Epithelial Cell Growth Kit (cat. no. PCAS-440-040, ATCC). Stock solutions of AITC (cat. no. 36682, Sigma-Aldrich, Madrid, CM, Spain), 4PI (cat. no. I0444, TCI; Paris, France), PEITC (cat. no. 253731, Sigma-Aldrich, Madrid, CM, Spain), SFN (cat. no. S4441, Sigma-Aldrich, Madrid, CM, Spain), IB (cat. no. ab141944, abcam, Cambridge, United Kingdom), I3C (cat. no. I7256, Sigma-Aldrich, Madrid, CM, Spain) and DOCE (cat. no. 01885; Sigma-Aldrich, Madrid, CM, Spain) were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO); cat. no. D2650; Sigma-Aldrich, Madrid, CM, Spain) and diluted with complete medium. An equal volume of DMSO (final concentration  $\leq 0.05\%$ ) was added to the controls.

#### 4.2. Cell Viability Assay

Effect of AITC, 4PI, PEITC, SFN, IB, I3C and/or DOCE treatments on viability of PC-3 and DU 145 cells was determined by trypan blue dye exclusion assay as described previously [29]. Briefly, cells ( $5 \times 10^3$ ) were seeded in six-well plates, and allowed to attach by overnight incubation. The medium was changed by fresh complete medium containing desired concentrations of AITC (5, 10, 15 and 20  $\mu\text{M}$ ), 4PI (10, 25, 50, 100, 500  $\mu\text{M}$ ), PEITC (1, 2, 4  $\mu\text{M}$ ), SFN (15, 20, 30  $\mu\text{M}$ ), IB (5, 15, 30  $\mu\text{M}$ ), I3C (100, 160, 285, 400  $\mu\text{M}$ ) and/or DOCE (1, 2 nM). Following incubation at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> for 24, 48 or 72 h, both floating and adherent cells were collected and suspended in 25 mL of PBS (cat. no. D8537; Sigma-Aldrich, Madrid, CM, Spain), mixed with 5 mL of 0.4% trypan blue solution (cat. no. T6146; Sigma-Aldrich, Madrid, CM, Spain) and counted under an inverted microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

#### 4.3. Determination of Apoptosis

Apoptosis induction in control (DMSO treated) and AITC-, PEITC-, SFN-, IB, and/or DOCE-treated PC cells was assessed by fluorescence after staining with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, cat. no. D9542; Sigma-Aldrich, Madrid, MD, Spain) [29]. DAPI is known to form fluorescent complexes with double-stranded DNA. Briefly,  $2 \times 10^4$  cells were seeded on coverslips and allowed to attach by overnight incubation. Then, cells were treated with DMSO, ITCs (AITC, PEITC, SFN, and IB) and/or DOCE at the same concentrations that were used to evaluate cellular viability. Following incubation at 37 °C for 72 h, the cells were washed with PBS, fixed with 3% paraformaldehyde for 1 h at room temperature, washed again with PBS, and permeabilized with 1% Triton X-100 (cat. no. 142314.1611142314.1611; Panreac, Barcelona, CAT, Spain) for 4 min. Finally and after washing with PBS, the cells were stained with 1  $\mu\text{g/mL}$  DAPI for 5 min and observed under fluorescence microscope at 40 $\times$  magnification. The apoptotic cells (with condensed and fragmented DNA) were counted. Minimum 300 cells were examined for each treatment, and the percentage of cells with apoptotic signs was calculated.

#### 4.4. Cytophatic Changes

PC cells ( $1 \times 10^4$  cells/well) were seeded in growth chambers (cat. no. C6932; Sigma-Aldrich, Madrid, MD, Spain) and incubated for 24 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. Then, the medium was replaced with fresh complete medium containing AITC (20  $\mu\text{M}$ ), SFN (30  $\mu\text{M}$ ), IB (30  $\mu\text{M}$ ), PEITC (4  $\mu\text{M}$ ) and/or DOCE (2 nM). After 72 h, PC-3 cells were stained according to previously published procedures [30]. Firstly, the treatments were replaced by PBS solution containing fluorescent dye CFDA-SE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, cat. no. 1351201EDU; Bio-Rad Laboratories, Madrid, MD, Spain) at 1 mM. After 15 min, the cells were washed with PBS, fixed with 70% ethanol for 5 min, washed again with PBS and stained with Phalloidin-ATTO 1:500 (Phalloidin-ATTO 647N, cat. no. 65906; Sigma-Aldrich, Madrid, MD, Spain). After 1 h, the cells were washed with sodium chloride (NaCl, cat. no. S7653; Sigma-Aldrich Madrid, MD, Spain) at 0.9% and stained with DAPI at 1  $\mu\text{g/mL}$  for 10 min. Finally, slides were embedded in Vecta Shield

antifade mounting medium (cat. no. H-1000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and cells were analyzed under a confocal microscope (Leica TCS SP5 X microscope, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

#### 4.5. In Vitro Invasion Assay

The invasion ability of PC-3 and DU 145 cells treated with AITC, PEITC, SFN, or IB, was detected using Millicell Cell Culture Inserts (cat. no. PIEP12R48; Merck Millipore, Madrid, MD, Spain) for 24-well plates [31]. Briefly, cells ( $1 \times 10^5$ ) were suspended in 100  $\mu$ L serum-free medium and added into the upper chamber. The lower chamber was filled with 600  $\mu$ L complete medium containing 10% fetal bovine serum (FBS; Life Technologies, Madrid, MD, Spain). Following incubation at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> for 72 h, the cells on the upper surface of the membranes were removed by wiping with a cotton swab. Finally, the membranes were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and stained with crystal violet (cat. no. C6158; Sigma-Aldrich Madrid, MD, Spain) for 15 min. The migrated cells were counted under a microscope (Olympus, Tokyo, Japan) in five randomly selected fields. At least three membranes from three different experiments were analyzed.

#### 4.6. Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Drug transporter- (multidrug resistance-associated protein-1, MRP1), drug metabolism- (CYP3A4), target- (DNA topoisomerase II, TopoII $\alpha$ ), migration- (CYP3A4), cell cycle/apoptosis-related (Bax, Bcl2, p21) genes were analyzed. PC cells ( $1 \times 10^4$  cells/well) were seeded in growth chambers (cat. no. C6932; Sigma-Aldrich, Madrid, MD, Spain) and incubated for 24 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. Then, the medium was replaced with fresh complete medium containing AITC (20  $\mu$ M), SFN (30  $\mu$ M), IB (30  $\mu$ M), PITC (4  $\mu$ M) and/or DOCE (2 nM). After 72 h, total RNA was extracted from PC-3 cells™ RNAspin Mini RNA Isolation Kit (Sigma-Aldrich) in accordance with the manufacturer's protocol. cDNAs were synthesized using a ReadyScript™ cDNA Synthesis Mix (Sigma-Aldrich). Real-time PCR reactions were performed using Fast Start SYBR Green Master (BioRad, Hercules, CA, USA). Reaction conditions were as follows: preheated at 95 °C for 3 min, 35 cycles of 94 °C for 30 s, 55–65 °C for 30 s and 72 °C for 40 s followed by 72 °C for 10 min. Quantification was done using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, which calculates the relative changes in gene expression of the target normalized to GAPDH. Primer sequences are listed in Table 2.

**Table 2.** Sequences of the primers used in reverse transcription-quantitative PCR assays.

Gen/Gene-Related Mechanism		Primes RT-qPCR (5'–3')
MRP1 Drug-transporter gene		F: TGTGGACGCTCAGAGTTCA R: CATCGCCATCACAGCATTG
CYP3A4 Drug-metabolism gene Migration gen		F: GGGAAAGCAGAGACAGGCAA R: AAGGGGTCTTGTGGATTGTTG
Topo II $\alpha$ Target genes		F: ATTCAAGAGGGGATATGATTCGG R: GGTTAAATACCAAAGGGGCATA
Cell cycle related genes/apoptosis- related genes	Bax	F: AGGATGCGTCCACCAAGAAG R: TGAAGTTGCCGTGAGAAAACA
	Bcl-	F: ATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC R: TGAGCAGAGTCTTCAGAGACAGCC
	p21	F: CCCGTGAGCGATGGAAC R: CGAGGCACAAGGGTACAAGA
GAPDH		F: GAAGACTGTGGATGGCCCCCTC R: GTTGAGGGCAATGCCAGCCCC

#### 4.7. Statistical Analysis

The results represent the mean of three independent experiments (mean  $\pm$  SD). Statistical analysis was conducted using the SPSS software package for Windows, version 21. Analysis between groups was carried out by using one way ANOVA. Difference was considered significant at  $p \leq 0.05$ .

### 5. Conclusions

The findings of the present study offer an encouraging perspective for the research of new approaches in the treatment of PC, with the natural compounds as key elements of combination therapies.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.G., E.P.-M., P.S., E.C., and P.V.; Formal analysis, M.J.N.-I., S.N., P.S., E.C., P.V., and M.F.-G.; Funding acquisition, M.J.N.-I., S.N., P.S., E.C., and P.V.; Investigation, M.J.N.-I., S.N., C.G., E.P.-M., and M.F.-G.; Methodology, M.J.N.-I., S.N., and M.F.-G.; Software, S.N. and C.G.; Supervision, M.J.N.-I., S.N., and M.F.-G.; Writing—original draft, M.J.N.-I., S.N., E.P.-M., and M.F.-G.; Writing—review & editing, M.J.N.-I., S.N., C.G., E.P.-M., P.S., E.C., P.V., and M.F.-G.

**Funding:** This research was supported by the Spanish National Plan for Research and Development, grant number AGL2012-9 35539, and financed by the European Regional Development Funds (FEDER).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

### Abbreviations

4PI	4-pentenyl-isothiocyanate
ADT	Androgen deprivation therapy
AIPC	Androgen-insensitive human prostate cancer
AITC	Allyl-isothiocyanate
CRPC	Castration-resistant prostate cancer
DOCE	Docetaxel
FBS	Fetal bovine serum
GS	Glucosinolates
GS-degradation products	Glucosinolates-degradation products
GSH	Glutathione
I3C	Indole-3-carbinol
IB	Iberin
ITC	Isothiocyanate
PC	Prostate cancer
PEC	Prostate epithelial cells
PEITC	Phenethyl-isothiocyanate
SFN	Sulforaphane

### Appendix A

**Table A1.** Analysis of synergy between AITC and DOCE calculated by survival rate for PC-3 cells.

	Docetaxel			AITC			Combination Treatment			Index <sup>5</sup>
	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Expected <sup>3</sup>	Observed <sup>4</sup>	$p^{2,*}$	
24 h	1	0.99	>0.05	5	0.9	<0.05	0.89	0.82	>0.05	1.09
	1	0.99	>0.05	10	0.78	<0.05	0.77	0.6	<0.05	1.28
	1	0.99	>0.05	15	0.71	<0.05	0.7	0.44	<0.05	1.59
	1	0.99	>0.05	20	0.66	<0.05	0.65	0.37	<0.05	1.76
	2	0.75	<0.05	5	0.9	<0.05	0.68	0.65	>0.05	1.05
	2	0.75	<0.05	10	0.78	<0.05	0.59	0.52	>0.05	1.13
	2	0.75	<0.05	15	0.71	<0.05	0.53	0.46	<0.05	1.15
	2	0.75	<0.05	20	0.66	<0.05	0.5	0.34	<0.05	1.47



Table A1. Cont.

	Docetaxel			AITC			Combination Treatment			Index <sup>5</sup>
	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Expected <sup>3</sup>	Observed <sup>4</sup>	$p^{2,*}$	
48 h	1	0.95	>0.05	5	0.86	<0.05	0.82	0.74	>0.05	1.11
	1	0.95	>0.05	10	0.69	<0.05	0.66	0.53	<0.05	1.25
	1	0.95	>0.05	15	0.62	<0.05	0.59	0.37	<0.05	1.59
	1	0.95	>0.05	20	0.57	<0.05	0.54	0.31	<0.05	1.74
	2	0.76	<0.05	5	0.86	<0.05	0.65	0.59	>0.05	1.1
	2	0.76	<0.05	10	0.69	<0.05	0.52	0.46	>0.05	1.13
	2	0.76	<0.05	15	0.62	<0.05	0.47	0.35	<0.05	1.34
	2	0.76	<0.05	20	0.57	<0.05	0.43	0.32	<0.05	1.34
72 h	1	0.95	>0.05	5	0.74	<0.05	0.7	0.69	>0.05	1.01
	1	0.95	>0.05	10	0.6	<0.05	0.57	0.46	<0.05	1.24
	1	0.95	>0.05	15	0.56	<0.05	0.53	0.31	<0.05	1.71
	1	0.95	>0.05	20	0.56	<0.05	0.53	0.27	<0.05	1.96
	2	0.66	<0.05	5	0.74	<0.05	0.49	0.48	>0.05	1.02
	2	0.66	<0.05	10	0.56	<0.05	0.46	0.36	<0.05	1.15
	2	0.66	<0.05	15	0.56	<0.05	0.46	0.36	<0.05	1.15
	2	0.66	<0.05	20	0.56	<0.05	0.46	0.36	<0.05	1.15

Abbreviations: AITC, allyl isothiocyanate; DMSO, dimethyl sulfoxide; DOCE, docetaxel; MSR, Mean survival rate. <sup>1</sup> MSR of treated group/DMSO-treated control group. <sup>2</sup>  $p$  value was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test. <sup>3</sup> Survival rate of DOCE group multiplied by survival rate of the AITC group. <sup>4</sup> Survival rate of combination treatment group (DOCE + AITC). <sup>5</sup> Index was calculated by dividing the expected survival rate by the observed survival rate. An index of >1 indicates synergistic effect and an index of <1 indicates less than additive effect. \*  $p < 0.05$ , significantly different compared with control treatment. ♦  $p < 0.05$ , comparison between expected and observed survival rate.

Table A2. Analysis of synergy between AITC and DOCE calculated by survival rate for DU 145 cells.

	Docetaxel			AITC			Combination Treatment			Index <sup>5</sup>
	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Expected <sup>3</sup>	Observed <sup>4</sup>	$p^{2,*}$	
24 h	1	0.98	>0.05	5	0.91	<0.05	0.89	0.83	>0.05	1.07
	1	0.98	>0.05	10	0.77	<0.05	0.75	0.73	>0.05	1.03
	1	0.98	>0.05	15	0.67	<0.05	0.66	0.63	>0.05	1.05
	1	0.98	>0.05	20	0.64	<0.05	0.63	0.59	>0.05	1.07
	2	0.75	<0.05	5	0.91	<0.05	0.68	0.67	>0.05	1.01
	2	0.75	<0.05	10	0.77	<0.05	0.58	0.57	>0.05	1.02
	2	0.75	<0.05	15	0.67	<0.05	0.5	0.49	>0.05	1.02
	2	0.75	<0.05	20	0.64	<0.05	0.48	0.46	>0.05	1.04
48 h	1	0.97	>0.05	5	0.86	<0.05	0.83	0.73	<0.05	1.14
	1	0.97	>0.05	10	0.72	<0.05	0.7	0.62	<0.05	1.13
	1	0.97	>0.05	15	0.6	<0.05	0.58	0.54	>0.05	1.07
	1	0.97	>0.05	20	0.59	<0.05	0.57	0.47	<0.05	1.21
	2	0.75	<0.05	5	0.86	<0.05	0.65	0.56	<0.05	1.16
	2	0.75	<0.05	10	0.72	<0.05	0.54	0.5	>0.05	1.08
	2	0.75	<0.05	15	0.6	<0.05	0.45	0.45	>0.05	1
	2	0.75	<0.05	20	0.59	<0.05	0.44	0.45	>0.05	0.98
72 h	1	0.93	>0.05	5	0.83	<0.05	0.77	0.69	<0.05	1.12
	1	0.93	>0.05	10	0.67	<0.05	0.62	0.55	<0.05	1.13
	1	0.93	>0.05	15	0.54	<0.05	0.5	0.46	>0.05	1.09
	1	0.93	>0.05	20	0.51	<0.05	0.47	0.36	<0.05	1.31
	2	0.65	<0.05	5	0.83	<0.05	0.54	0.47	<0.05	1.15
	2	0.65	<0.05	10	0.67	<0.05	0.44	0.42	>0.05	1.05
	2	0.65	<0.05	15	0.54	<0.05	0.33	0.36	>0.05	0.97
	2	0.65	<0.05	20	0.51	<0.05	0.33	0.33	>0.05	1

Abbreviations: AITC, allyl isothiocyanate; DMSO, dimethyl sulfoxide; DOCE, docetaxel; MSR, Mean survival rate. <sup>1</sup> MSR of treated group/DMSO-treated control group. <sup>2</sup>  $p$  value was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test. <sup>3</sup> Survival rate of DOCE group multiplied by survival rate of the AITC group. <sup>4</sup> Survival rate of combination treatment group (DOCE + AITC). <sup>5</sup> Index was calculated by dividing the expected survival rate by the observed survival rate. An index of >1 indicates synergistic effect and an index of <1 indicates less than additive effect. \*  $p < 0.05$ , significantly different compared with control treatment. ♦  $p < 0.05$ , comparison between expected and observed survival rate.

**Table A3.** Analysis of synergy between SFN and DOCE calculated by survival rate for PC-3 cells.

	Docetaxel			SFN			Combination Treatment			Index <sup>5</sup>
	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Expected <sup>3</sup>	Observed <sup>4</sup>	$p^{2,*}$	
24 h	1	0.99	>0.05	15	0.86	<0.05	0.85	0.87	>0.05	0.98
	1	0.99	>0.05	20	0.85	<0.05	0.84	0.86	>0.05	0.98
	1	0.99	>0.05	30	0.81	<0.05	0.8	0.86	>0.05	0.93
	2	0.75	<0.05	15	0.86	<0.05	0.65	0.67	>0.05	0.97
	2	0.75	<0.05	20	0.85	<0.05	0.64	0.67	>0.05	0.96
	2	0.75	<0.05	30	0.81	<0.05	0.61	0.65	>0.05	0.94
48 h	1	0.95	>0.05	15	0.76	<0.05	0.72	0.74	>0.05	0.97
	1	0.95	>0.05	20	0.72	<0.05	0.68	0.74	>0.05	0.92
	1	0.95	>0.05	30	0.72	<0.05	0.68	0.73	>0.05	0.93
	2	0.76	<0.05	15	0.76	<0.05	0.58	0.64	<0.05	0.91
	2	0.76	<0.05	20	0.72	<0.05	0.55	0.62	<0.05	0.89
72 h	1	0.95	>0.05	15	0.72	<0.05	0.68	0.68	>0.05	1
	1	0.95	>0.05	20	0.61	<0.05	0.58	0.62	>0.05	0.94
	1	0.95	>0.05	30	0.59	<0.05	0.56	0.61	>0.05	0.92
	2	0.66	<0.05	15	0.61	<0.05	0.4	0.39	>0.05	1.03
	2	0.66	<0.05	20	0.61	<0.05	0.4	0.39	>0.05	1.03

Abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide; DOCE, docetaxel; MSR, mean survival rate; SFN, sulforaphane. <sup>1</sup> MSR of treated group/DMSO-treated control group. <sup>2</sup>  $p$  value was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test. <sup>3</sup> Survival rate of DOCE group multiplied by survival rate of the SFN group. <sup>4</sup> Survival rate of combination treatment group (DOCE + SFN). <sup>5</sup> Index was calculated by dividing the expected survival rate by the observed survival rate. An index of >1 indicates synergistic effect and an index of <1 indicates less than additive effect. \*  $p < 0.05$ , significantly different compared with control treatment. ♦  $p < 0.05$ , comparison between expected and observed survival rate.

**Table A4.** Analysis of synergy between SFN and DOCE calculated by survival rate for DU 145 cells.

	Docetaxel			SFN			Combination Treatment			Index <sup>5</sup>
	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Observed <sup>4</sup>	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	
24 h	1	0.98	>0.05	15	0.92	>0.05	0.9	0.92	>0.05	0.98
	1	0.98	>0.05	20	0.85	<0.05	0.83	0.83	>0.05	1
	1	0.98	>0.05	30	0.85	<0.05	0.83	0.84	>0.05	0.99
	2	0.75	<0.05	15	0.92	>0.05	0.69	0.79	<0.05	0.87
	2	0.75	<0.05	20	0.85	<0.05	0.64	0.65	>0.05	0.98
	2	0.75	<0.05	30	0.85	<0.05	0.64	0.65	>0.05	0.98
48 h	1	1	>0.05	15	0.71	<0.05	0.71	0.69	>0.05	1.03
	1	1	>0.05	20	0.71	<0.05	0.71	0.69	>0.05	1.03
	1	1	>0.05	30	0.7	<0.05	0.7	0.64	>0.05	1.09
	2	0.77	<0.05	15	0.71	<0.05	0.55	0.22	<0.05	2.5
	2	0.77	<0.05	20	0.71	<0.05	0.55	0.2	<0.05	2.75
72 h	1	0.98	>0.05	15	0.43	<0.05	0.42	0.37	>0.05	1.14
	1	0.98	>0.05	20	0.43	<0.05	0.42	0.36	>0.05	1.17
	1	0.98	>0.05	30	0.4	<0.05	0.39	0.33	>0.05	1.18
	2	0.68	<0.05	15	0.43	<0.05	0.29	0.21	>0.05	1.38

Abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide; DOCE, docetaxel; MSR, mean survival rate; SFN, sulforaphane. <sup>1</sup> MSR of treated group/DMSO-treated control group. <sup>2</sup>  $p$  value was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test. <sup>3</sup> Survival rate of DOCE group multiplied by survival rate of the SFN group. <sup>4</sup> Survival rate of combination treatment group (DOCE + SFN). <sup>5</sup> Index was calculated by dividing the expected survival rate by the observed survival rate. An index of >1 indicates synergistic effect and an index of <1 indicates less than additive effect. \*  $p < 0.05$ , significantly different compared with control treatment. ♦  $p < 0.05$ , comparison between expected and observed survival rate.



**Table A5.** Analysis of synergy between IB and DOCE calculated by survival rate for PC-3 cells.

	Docetaxel			IB			Combination Treatment			Index <sup>5</sup>
	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Expected <sup>3</sup>	Observed <sup>4</sup>	$p^{2,*}$	
24 h	1	0.99	>0.05	5	0.94	>0.05	0.93	0.9	>0.05	1.03
	1	0.99	>0.05	15	0.91	>0.05	0.9	0.89	>0.05	1.01
	1	0.99	>0.05	30	0.89	<0.05	0.88	0.88	>0.05	1
	2	0.75	<0.05	5	0.94	>0.05	0.71	0.66	>0.05	1.08
	2	0.75	<0.05	15	0.91	>0.05	0.68	0.64	>0.05	1.06
	2	0.75	<0.05	30	0.89	<0.05	0.67	0.65	>0.05	1.03
48 h	1	0.95	>0.05	5	0.96	>0.05	0.91	0.81	<0.05	1.12
	1	0.95	>0.05	15	0.81	<0.05	0.77	0.6	<0.05	1.28
	1	0.95	>0.05	30	0.66	<0.05	0.63	0.51	<0.05	1.24
	2	0.76	<0.05	5	0.96	>0.05	0.73	0.62	<0.05	1.18
	2	0.76	<0.05	15	0.81	<0.05	0.62	0.48	<0.05	1.29
	2	0.76	<0.05	30	0.66	<0.05	0.5	0.34	<0.05	1.47
72 h	1	0.95	>0.05	5	0.81	<0.05	0.77	0.73	>0.05	1.05
	1	0.95	>0.05	15	0.58	<0.05	0.55	0.54	>0.05	1.02
	1	0.95	>0.05	30	0.45	<0.05	0.43	0.42	>0.05	1.02
	2	0.66	<0.05	5	0.81	<0.05	0.53	0.45	>0.05	1.18
	2	0.66	<0.05	15	0.58	<0.05	0.38	0.36	>0.05	1.06
	2	0.66	<0.05	30	0.45	<0.05	0.3	0.29	>0.05	1.03

Abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide; DOCE, docetaxel; IB, iberin; MSR, mean survival rate. <sup>1</sup> MSR of treated group/DMSO-treated control group. <sup>2</sup>  $p$  value was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test. <sup>3</sup> Survival rate of DOCE group multiplied by survival rate of the IB group. <sup>4</sup> Survival rate of combination treatment group (DOCE + IB). <sup>5</sup> Index was calculated by dividing the expected survival rate by the observed survival rate. An index of >1 indicates synergistic effect and an index of <1 indicates less than additive effect. \*  $p < 0.05$ , significantly different compared with control treatment.  $\diamond p < 0.05$ , comparison between expected and observed survival rate.

**Table A6.** Analysis of synergy between IB and DOCE calculated by survival rate for DU 145 cells.

	Docetaxel			IB			Combination Treatment			Index <sup>5</sup>
	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Expected <sup>3</sup>	Observed <sup>4</sup>	$p^{2,*}$	
24 h	1	0.98	>0.05	5	0.61	<0.05	0.6	0.95	<0.05	0.63
	1	0.98	>0.05	15	0.67	<0.05	0.66	0.93	<0.05	0.71
	1	0.98	>0.05	30	0.7	<0.05	0.69	0.9	<0.05	0.77
	2	0.75	<0.05	5	0.61	<0.05	0.46	0.79	<0.05	0.58
	2	0.75	<0.05	15	0.67	<0.05	0.5	0.73	<0.05	0.68
	2	0.75	<0.05	30	0.7	<0.05	0.53	0.77	<0.05	0.69
48 h	1	1	>0.05	5	0.75	<0.05	0.75	0.92	<0.05	0.82
	1	1	>0.05	15	0.79	<0.05	0.79	0.95	<0.05	0.83
	1	1	>0.05	30	0.72	<0.05	0.72	0.51	<0.05	1.41
	2	0.77	<0.05	5	0.75	<0.05	0.58	0.81	<0.05	0.72
	2	0.77	<0.05	15	0.79	<0.05	0.61	0.74	<0.05	0.82
	2	0.77	<0.05	30	0.72	<0.05	0.55	0.7	<0.05	0.79
72 h	1	0.98	>0.05	5	0.93	>0.05	0.91	0.74	<0.05	1.23
	1	0.98	>0.05	15	0.84	<0.05	0.82	0.41	<0.05	2
	1	0.98	>0.05	30	0.4	<0.05	0.39	0.32	>0.05	1.22
	2	0.68	<0.05	5	0.93	>0.05	0.63	0.38	>0.05	1.07
	2	0.68	<0.05	15	0.84	<0.05	0.57	0.55	>0.05	1.04
	2	0.68	<0.05	30	0.4	<0.05	0.37	0.47	>0.05	0.97

Abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide; DOCE, docetaxel; IB, iberin; MSR, mean survival rate. <sup>1</sup> MSR of treated group/DMSO-treated control group. <sup>2</sup>  $p$  value was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test. <sup>3</sup> Survival rate of DOCE group multiplied by survival rate of the IB group. <sup>4</sup> Survival rate of combination treatment group (DOCE + IB). <sup>5</sup> Index was calculated by dividing the expected survival rate by the observed survival rate. An index of >1 indicates synergistic effect and an index of <1 indicates less than additive effect. \*  $p < 0.05$ , significantly different compared with control treatment.  $\diamond p < 0.05$ , comparison between expected and observed survival rate.

**Table A7.** Analysis of synergy between PEITC and DOCE calculated by survival rate for PC-3 cells.

	Docetaxel			PEITC			Combination Treatment			Index <sup>5</sup>
	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Expected <sup>3</sup>	Observed <sup>4</sup>	$p^{2,\diamond}$	
24 h	1	0.99	>0.05	1	0.86	<0.05	0.85	0.78	>0.05	1.09
	1	0.99	>0.05	2	0.53	<0.05	0.52	0.44	<0.05	1.18
	1	0.99	>0.05	4	0.51	<0.05	0.5	0.42	<0.05	1.19
	2	0.75	<0.05	1	0.86	<0.05	0.65	0.47	<0.05	1.38
	2	0.75	<0.05	2	0.53	<0.05	0.4	0.36	>0.05	1.11
	2	0.75	<0.05	4	0.51	<0.05	0.38	0.34	>0.05	1.12
48 h	1	0.95	>0.05	1	0.84	<0.05	0.8	0.77	>0.05	1.04
	1	0.95	>0.05	2	0.58	<0.05	0.55	0.42	<0.05	1.31
	1	0.95	>0.05	4	0.56	<0.05	0.53	0.41	<0.05	1.29
	2	0.76	<0.05	1	0.84	<0.05	0.64	0.51	<0.05	1.25
	2	0.76	<0.05	2	0.58	<0.05	0.44	0.32	<0.05	1.38
	2	0.76	<0.05	4	0.56	<0.05	0.43	0.31	<0.05	1.39
72 h	1	0.95	>0.05	1	0.81	<0.05	0.77	0.75	>0.05	1.03
	1	0.95	>0.05	2	0.52	<0.05	0.49	0.39	<0.05	1.26
	1	0.95	>0.05	4	0.51	<0.05	0.48	0.37	<0.05	1.3
	2	0.86	<0.05	1	0.81	<0.05	0.53	0.47	<0.05	1.13
	2	0.86	<0.05	2	0.52	<0.05	0.49	0.39	<0.05	1.26
	2	0.86	<0.05	4	0.51	<0.05	0.48	0.37	<0.05	1.3

Abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide; DOCE, docetaxel; MSR, mean survival rate; PEITC, phenethyl-ITC. <sup>1</sup> MSR of treated group/DMSO-treated control group. <sup>2</sup>  $p$  value was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test. <sup>3</sup> Survival rate of DOCE group multiplied by survival rate of the PEITC group. <sup>4</sup> Survival rate of combination treatment group (DOCE + PEITC). <sup>5</sup> Index was calculated by dividing the expected survival rate by the observed survival rate. An index of >1 indicates synergistic effect and an index of <1 indicates less than additive effect. \*  $p < 0.05$ , significantly different compared with control treatment.  $\diamond p < 0.05$ , comparison between expected and observed survival rate.

**Table A8.** Analysis of synergy between PEITC and DOCE calculated by survival rate for DU 145 cells.

	Docetaxel			PEITC			Combination Treatment			Index <sup>5</sup>
	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Dose	MSR <sup>1</sup>	$p^{2,*}$	Expected <sup>3</sup>	Observed <sup>4</sup>	$p^{2,\diamond}$	
24 h	1	0.98	>0.05	1	0.9	<0.05	0.88	0.87	>0.05	1.01
	1	0.98	>0.05	2	0.72	<0.05	0.71	0.67	>0.05	1.06
	1	0.98	>0.05	4	0.45	<0.05	0.44	0.44	>0.05	1
	2	0.75	<0.05	1	0.9	<0.05	0.68	0.6	>0.05	1.13
	2	0.75	<0.05	2	0.72	<0.05	0.54	0.46	<0.05	1.17
	2	0.75	<0.05	4	0.45	<0.05	0.34	0.33	>0.05	1.03
48 h	1	1	>0.05	1	0.85	<0.05	0.85	0.84	>0.05	1.01
	1	1	>0.05	2	0.66	<0.05	0.66	0.61	>0.05	1.08
	1	1	>0.05	4	0.48	<0.05	0.48	0.4	>0.05	1.2
	2	0.77	<0.05	1	0.85	<0.05	0.65	0.61	>0.05	1.07
	2	0.77	<0.05	2	0.66	<0.05	0.51	0.48	>0.05	1.06
	2	0.77	<0.05	4	0.48	<0.05	0.37	0.35	>0.05	1.06
72 h	1	0.98	>0.05	1	0.82	<0.05	0.8	0.8	>0.05	1
	1	0.98	>0.05	2	0.67	<0.05	0.66	0.58	<0.05	1.14
	1	0.98	>0.05	4	0.45	<0.05	0.44	0.44	>0.05	1
	2	0.88	<0.05	1	0.82	<0.05	0.86	0.78	<0.05	1.04
	2	0.88	<0.05	2	0.67	<0.05	0.66	0.58	<0.05	1.14
	2	0.88	<0.05	4	0.45	<0.05	0.44	0.44	>0.05	1

Abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide; DOCE, docetaxel; MSR, mean survival rate; PEITC, phenethyl-ITC. <sup>1</sup> MSR of treated group/DMSO-treated control group. <sup>2</sup>  $p$  value was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test. <sup>3</sup> Survival rate of DOCE group multiplied by survival rate of the PEITC group. <sup>4</sup> Survival rate of combination treatment group (DOCE + PEITC). <sup>5</sup> Index was calculated by dividing the expected survival rate by the observed survival rate. An index of >1 indicates synergistic effect and an index of <1 indicates less than additive effect. \*  $p < 0.05$ , significantly different compared with control treatment.  $\diamond p < 0.05$ , comparison between expected and observed survival rate.

## References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 7–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. McNamara, M.; Sweeney, C.; Antonarakis, E.S.; Armstrong, A.J. The evolving landscape of metastatic hormone-sensitive prostate cancer: A critical review of the evidence for adding docetaxel or abiraterone to androgen deprivation. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2018**, *21*, 306–318. [[CrossRef](#)]
3. Tonyali, S.; Haberal, H.B.; Sogutdelen, E. Toxicity, adverse events, and quality of life associated with the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Curr. Urol.* **2017**, *10*, 169–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Novio, S.; Freire-Garabal, M.; Nunez, M.J. Target driven preclinical screening for new antimitotic chemotherapy agents. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 2263–2271. [[CrossRef](#)]
5. Kapusta-Duch, J.; Kopeć, A.; Piatkowska, E.; Borczak, B.; Leszczyńska, T. The beneficial effects of Brassica vegetables on human health. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* **2012**, *63*, 389–395. [[PubMed](#)]
6. Abdull, R.; Ahmad, F.; Noor, N.M. Cruciferous vegetables: Dietary phytochemicals for cancer prevention. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2013**, *14*, 1565–1570. [[CrossRef](#)]
7. Wagner, A.E.; Terschluessen, A.M.; Rimbach, G. Health promoting effects of brassica-derived phytochemicals: From chemopreventive and anti-inflammatory activities to epigenetic regulation. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2013**, *2013*, 964539:1–964539:12. [[CrossRef](#)]
8. Novio, S.; Cartea, M.E.; Soengas, P.; Freire-Garabal, M.; Nunez-Iglesias, M.J. Effects of Brassicaceae isothiocyanates on prostate cancer. *Molecules* **2016**, *21*, 626. [[CrossRef](#)]
9. Xiao, D.; Singh, S.V. Phenethyl isothiocyanate sensitizes androgen-independent human prostate cancer cells to docetaxel-induced apoptosis in vitro and in vivo. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 722–731. [[CrossRef](#)]
10. Nunez-Iglesias, M.J.; Novio, S.; Garcia-Santiago, C.; Cartea, M.E.; Soengas, P.; Velasco, P.; Freire-Garabal, M. Effects of 3-butenyl isothiocyanate on phenotypically different prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2018**, *53*, 2213–2223.
11. Lee, H.Y.; Oh, S.H.; Suh, Y.A.; Baek, J.H.; Papadimitrakopoulou, V.; Huang, S.; Hong, W.K. Response of non-small cell lung cancer cells to the inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- and MAPK kinase 4/c-Jun NH2-terminal kinase pathways: An effective therapeutic strategy for lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 6065–6074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Dong, L.; Zieren, R.C.; Xue, W.; de Reijke, T.M.; Pienta, K.J. Metastatic prostate cancer remains incurable, why? *Asian J. Urol.* **2019**, *6*, 26–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Xiao, D.; Srivastava, S.K.; Lew, K.L.; Zeng, Y.; Hershberger, P.; Johnson, C.S.; Trump, D.L.; Singh, S.V. Allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables, inhibits proliferation of human prostate cancer cells by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Carcinogenesis* **2003**, *24*, 891–897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Tang, N.Y.; Huang, Y.T.; Yu, C.S.; Ko, Y.C.; Wu, S.H.; Ji, B.C.; Yang, J.S.; Yang, J.L.; Hsia, T.C.; Chen, Y.Y.; et al. Phenethyl isothiocyanate (PEITC) promotes G2/M phase arrest via p53 expression and induces apoptosis through caspase- and mitochondria-dependent signaling pathways in human prostate cancer DU 145 cells. *Anticancer Res.* **2011**, *31*, 1691–1702. [[PubMed](#)]
15. Clarke, J.D.; Dashwood, R.H.; Ho, E. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Lett.* **2008**, *269*, 291–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Hahm, E.R.; Chandra-Kuntal, K.; Desai, D.; Amin, S.; Singh, S.V. Notch activation is dispensable for D, L-sulforaphane-mediated inhibition of human prostate cancer cell migration. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Shankar, S.; Ganapathy, S.; Srivastava, R.K. Sulforaphane enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer orthotopic model through regulation of apoptosis, metastasis, and angiogenesis. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6855–6866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zhang, Y. The molecular basis that unifies the metabolism, cellular uptake and chemopreventive activities of dietary isothiocyanates. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 2–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Shamloo, B.; Usluer, S. p21 in cancer research. *Cancers* **2019**, *11*, 1178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Westphal, D.; Dewson, G.; Czabotar, P.E.; Kluck, R.M. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1813*, 521–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Stanton, R.A.; Gernert, K.M.; Nettles, J.H.; Aneja, R. Drugs that target dynamic microtubules: A new molecular perspective. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31*, 443–481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Mi, L.; Gan, N.; Cheema, A.; Dakshanamurthy, S.; Wang, X.; Yang, D.C.; Chung, F.L. Cancer preventive isothiocyanates induce selective degradation of cellular alpha- and beta-tubulins by proteasomes. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 17039–17051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Tseng, E.; Kamath, A.; Morris, M.E. Effect of organic isothiocyanates on the P-glycoprotein- and MRP1-mediated transport of daunomycin and vinblastine. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1509–1515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Cole, S.P. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a “multitasking” ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 30880–30888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Maguire, O.; Pollock, C.; Martin, P.; Owen, A.; Smyth, T.; Doherty, D.; Campbell, M.J.; McClean, S.; Thompson, P. Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 expression and modulation of “intracrine” metabolism of androgens in prostate cells by liganded vitamin D receptor. *Mol. Cell Endocrinol.* **2012**, *364*, 54–64. [[CrossRef](#)]
26. Fujimura, T.; Takahashi, S.; Urano, T.; Kumagai, J.; Murata, T.; Takayama, K.; Ogushi, T.; Horie-Inoue, K.; Ouchi, Y.; Kitamura, T.; et al. Expression of cytochrome P450 3A4 and its clinical significance in human prostate cancer. *Urology* **2009**, *74*, 391–397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Jernberg, E.; Bergh, A.; Wikström, P. Clinical relevance of androgen receptor alterations in prostate cancer. *Endocr. Connect.* **2017**, *6*, R146–R161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Jayakumar, S.; Kunwar, A.; Sandur, S.K.; Pandey, B.N.; Chaubey, R.C. Differential response of DU 145 and PC3 prostate cancer cells to ionizing radiation: Role of reactive oxygen species, GSH and Nrf2 in radiosensitivity. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 485–494. [[CrossRef](#)]
29. Xiao, D.; Vogel, V.; Singh, S.V. Benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in human breast cancer cells is initiated by reactive oxygen species and regulated by Bax and Bak. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 2931–2945. [[CrossRef](#)]
30. Hejchman, E.; Taciak, P.; Kowalski, S.; Maciejewska, D.; Czajkowska, A.; Borowska, J.; Śladowski, D.; Młynarczuk-Biały, I. Synthesis and anticancer activity of 7-hydroxycoumarinyl gallates. *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67*, 236–244. [[CrossRef](#)]
31. Mao, L.; Yang, C.; Wang, J.; Li, W.; Wen, R.; Chen, J.; Zheng, J. SATB1 is overexpressed in metastatic prostate cancer and promotes prostate cancer cell growth and invasion. *J. Transl. Med.* **2013**, *11*, 111:1–111:10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

# Effects of Brassicaceae on Breast Cancer

## Authors:

Pérez-Muñuzuri E<sup>1,4\*</sup>, Núñez-Iglesias MJ<sup>1</sup>, Novío S<sup>1</sup>, Cartea ME<sup>3</sup>, García-Santiago C<sup>1</sup>, Soengas P<sup>3</sup>, Macía M<sup>2,4</sup>, Freire-Garabal M<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Lennart Levi Stress and Neuroimmunology (SNL) Laboratory, School of Medicine and Dentistry, University of Santiago de Compostela, C/ San Francisco, s/n, 15782 Santiago de Compostela, A Coruña, Spain.  
elena\_munuzuri@hotmail.com

<sup>2</sup> Department of Forensic Sciences, Pathology, Gynecology and Obstetrics, and Pediatrics. University of Santiago de Compostela, C/ San Francisco, s/n, 15782 Santiago de Compostela, A Coruña, Spain.

<sup>3</sup> Group of Genetics, Breeding and Biochemistry of Brassicas, Misión Biológica de Galicia (CSIC), Aptdo. 28, 36080 Pontevedra, Spain. [ecartea@mbg.csic.es](mailto:ecartea@mbg.csic.es).

<sup>4</sup> Galician Institute of Gynecology. HM Hospitals (Spain).

\* Author for correspondence

## Summary

Many studies try to correlate types of diet with beneficial vs. adverse effects on cancer. *Brassicaceae* family includes vegetables widely recognized as responsible for the beneficial effects of some types of diet, including the Mediterranean one, against cancer. These effects are associated to their content in glucosinolates that are metabolized to various bioactive breakdown products by an endogenous enzyme called myrosinase to produce a range of hydrolysis products as isothiocyanates (ITCs), thiocyanates, oxazolidine-2-thione and nitriles. They are known for a variety of therapeutic effects, including antioxidant, immunostimulatory, anti-inflammatory or antimicrobial, and, thanks to *in vitro* and animal studies, we consider their potential anticancer properties. In this report we summarize the effects of ITCs on breast cancer that include epigenetic changes, cell cycle arrest, activation of apoptosis pathways, and inhibition of migration and metastasis, autophagy and angiogenesis. We also analyze specific molecular targets responsible for the anticancer effects of ITCs.

### KEYWORDS:

Angiogenesis; apoptosis; breast cancer, carcinogenesis; cell cycle; chemoprevention; epigenetics; glucosinolates; isothiocyanates; metastasis; therapy resistance.

## 51 1. ntroduction

52 Many studies try to correlate some types of diets with beneficial vs. adverse  
53 effects on cancer (Zhang et al., 2016). Regarding breast cancer, there are some  
54 intriguing studies demonsrating preventive (Velie et al., 2005; Novio et al., 2016)  
55 and/or therapeutic effects of the so-called “Mediterranean Diet” on breast  
56 cancer (López-Guarnido et al., 2014). Amongst them, the *Brassicaceae* or  
57 cruciferous family vegetables are popular in west of Europe and in some  
58 countries of Asia. This famiy includes species like *B. juncea* (brown and leaf  
59 mustards), *B. oleracea* (cauliflower, Brussels sprouts, broccoli, kale), *B. rapa*  
60 (turnip greens), *B. napus* (canola, leaf rape), *B. nigra* (black mustard), *Sinapis*  
61 *alba* (white mustard), *Raphanus sativus* (radish), *Eruca sativa* (salad rocket)  
62 and *Diplotaxis tenuifolia* (perennial wall-rock).

63  
64 They are widely recognized as responsible of the beneficial effects against  
65 cancer and other diseases (Higdon et al., 2007; Capuano et al., 2017). Many of  
66 their beneficial effects on health are associated to their content in glucosinolates  
67 (GSL) that also provide them with a typical smell and taste. GSL are  $\beta$ -  
68 thioglucoside N-hydroxysulphates containing a side chain and a  $\beta$ -D-  
69 glucopyranosyl moiety. Upon cellular disruption, they are metabolized to various  
70 bioactive breakdown products by an endogenous enzyme called myrosinase to  
71 produce a range of hydrolysis products as isothiocyanates (ITCs), thiocyanates,  
72 oxazolidine-2-thione and nitriles, depending on the initial GSL or the myrosinase  
73 type (Farsinejad-Marj et al., 2015; Higdon et al., 2007). Cooking procedure can  
74 cause a total or partial myrosinase inactivation and thus, affect the total amount  
75 of the available active metabolite in the diet (Higdon et al., 2007). Table 1



details GSL present in the Brassicaceae family, their hydrolysis products and the name of the vegetables rich in those products.

## **2. Recent and current trials with Brassicaceae and breast cancer**

There are several phase 2 clinical trials using GSL hydrolysis derivatives in patients suffering of breast cancer going on (NCT00982319). Also, other trials are focused on lung cancer trying to determine if GSL derivatives can be a chemopreventive tool in smokers (NCT00005883, NCT00691132).

Nevertheless, previous studies have demonstrated that not all types of breast cancer benefit from these compounds. GSL was seen to be useful in ductal *in situ* breast cancer, decreasing the Ki67 proliferation biomarker (Cade et al., 2011) as well as histone acetylation, a well known antitumor mechanism (Atwell et al., 2015; Higdon et al., 2007, [NCT00843167](#)). Two clinical trials are also being carried out trying to determine whether hormone receptor type ([NCT01612910](#)), cell differentiation grade and hormone concomitant treatment ([NCT02970682](#)) can be influenced by nutritional supplementation. ([NCT02970682](#)).

## **3. Glucosinolates anticarcinogenic mechanisms.**

In this review, we are going to analyze how GSL hydrolysis derivatives can inhibit cell proliferation, induce apoptosis as well as inhibit cancer metastatization both in *in vivo* and *in vitro* assays. Moreover, we will discuss the potential implications of these molecules onto the epigenetic theory of carcinogenesis framework (Wattenberg et al., 1966).



101 101

## 102 3.1. Epigenetic activity: (Table 2)

### 103 3.1.1. In vitro studies

104 Since 2012, breast cancer was classified in four molecular subtypes: Luminal A,  
105 Luminal B, HER-2 and basal-like. Epigenetics studies of cancer let even divide  
106 these subtypes in more subtypes. These epigenetic types include modifications  
107 in DNA, like histone acetylation and methylation, DNA hypomethylation and  
108 hypermethylation, and post-transcriptional regulation of gene expression by  
109 noncoding micro RNAs (miRNAs) in which the change is on the function of the  
110 DNA not based on its sequences (The Cancer Genome Atlas Network, 2012).  
111 Epigenetics is now being considered a key element of cancer development and  
112 progression; so different strategies are being designed to prevent adverse and  
113 favor beneficial epigenetic modifiers of cancer, including diet-associated factors  
114 that can regulate epigenetic changes that affect breast cancer (Dumitrescu et  
1151 al., 2018).

1  
5

1161  
1  
6

117 According to Lewinska et al. (2017), SFN has an epigenetic effect mediated by  
118 DNA hypomethylation; decreasing levels of DNA methyltransferases (DNMT1,  
119 DNMT3B) and diminishing N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) RNA methylation. SFN  
120 (10 µM) also produces an up regulation of sixty micro RNAs, a down regulation  
121 of thirty two microRNAs, and also decrease in the levels of miR-23b, miR-92b,  
122 miR-381 and miR-382 in three breast cancer cells (MCF-7, MDA-MB-231, SK-  
1231 BR-3) in a significant manner.

2  
3

1241  
2  
4

Gianfredi et al. (2017) carried out a systematic review of SFN epigenetic mechanisms on MDA-MB-231 cell line. They studied some genes like those responsible for phosphatase and tensin homologue (PTEN), retinoic acid receptor beta 2 (RAR $\beta$ 2), human telomerase reverse transcriptase (hTERT), ER $\alpha$ , caveolin 1 (CAV1), and interleukin 6 (IL6). After treatment with SFN, all genes but hTERT resulted up regulated. Treatments with SFN were found to decrease in a 22% of the methylation of the PTEN promoter. This supposed a dose-dependent increase of a 72% in mRNA PTEN. SFN also decreased methylation of a 25% in RAR $\beta$ 2 promoter, what means an increase of 95% of mRNA RAR $\beta$ 2. A decrease in hTERT methylation was also observed, what means a down-regulating of this gene expression. A decrease on acethylation on the CpG islands of the ER $\alpha$  implies the reactivation of these receptors in ER $\alpha$ -negative cells. CAV-1 was up-regulated after a demethylation of its promoter. IL-6 also was demonstrated to be over-expressed.

Meeram et al. (2010) obtained similar results, observing a decrease in hTERT expression after treatments with SFN in MDA-MB-231 but also in MCF-7 cells. This could be a very important anticarcinogenic mechanism because while normal breast cells have low level, breast cancer cells have a high expression of telomerase.

Other studies were performed using other ITC derivates. Treatment with I3C as well as its product of condensation, 3'-diindolylmethane (DIM) prevented epigenetic activation of the cyclooxygenase-2 (COX-2) gene by Ah-R agonists

149 in MCF7 cells (Degner et al., 2009). This effect is based in that high levels of



COX-2 are associated with carcinogenesis and that this gene is activated with aryl hydrocarbon receptor (AhR) that, in turn, is activated by some dietary and pollution compounds like polycyclic aryl hydrocarbons (Degner et al., 2009).

5  
2

Phenethyl isothiocyanate (PEITC) has been tested in other type of tumors like prostate, leukemia and myeloma and has been demonstrated its chemopreventive value as through an epigenetic mechanism (Boyanapalli et al., 2016). A synergistic epigenetic-mediated effect with the chemotherapeutic compound taxol has also been demonstrated in breast cancer. Taxol acts via inhibiting microtubule disassembly when it binds to assembled tubulin, locking microtubules in polymerized state. In this study, PEITC was found to induce hyperacetylation of alpha-tubulin in two different breast cancer cell lines, MDA-MB and MCF-7, potentiating the effects of taxol on this parameter (Liu et al., 2013; Cang et al., 2014).

6  
3

### 3.1.2. In vivo studies

Polish population, that consume three times more cabbage than those from other nationalities, have lower incidence of breast cancer specially when this vegetable is incorporated to the diet at a young age (Li et al., 2018).

6  
8

Li et al. (2018) tried to demonstrate that maternal diet could influence on the epigenetic programming of the fetus during embryogenesis. This study was

6  
9

172 performed with a transgenic mice that have been fed up with broccoli sprouts  
173 rich diet. The results verify the epigenetic reactivation of tumor suppressor  
174 genes, the inhibition of tumor promoting genes such as hTERT and c-Myc, the



down regulation of HDAC1 (histone deacetylase1) and the increase of histone acetylation that contribute to the reactivation of some suppressor genes like p53 and p16. Therefore, these authors also pointed out a transplacental chemopreventive and fetal programming effect of diet based on an epigenetic mechanism.

7  
9

8  
0

### **3.2 Effects on Cell Cycle:**

The function of the cell cycle is to replicate all the components of the cell and segregate it in two equal new cells. DNA replication occurs in S phase and segregation in M phase or mitosis phase. Two lapse phases are in the middle G1 and G2, when the cell gains mass and grows. The most important proteins that regulate this cycle are cyclin-dependent kinases (CDKs) that work phosphorylating substrates to make DNA. When they do not work normally, this can be the origin of a cancer (Kevin et al., 2014). The transitions between G1-S and G2-M are regulated by CDKs, so Cdk2/Cdk4/Cdk6 controls the transition G2-M and Cdk1/Cdk2 the transition G1-S (Caldon et al., 2006).

9  
0

9  
1

#### **3.2.1. Sulphoraphane (SFN):**

SFN inhibits the proliferation and mitosis of MCF-7 cells. The disruption of mitotic microtubules, the arrest of the cell cycle at G2-M - as some anticancer drugs do - are the main mechanisms of its action (Jackson and Singletary, 2004a; Azarenko et al., 2008). The rise on cyclin B1 and cdk2 is clear at this stage. SFN also inhibits the proliferation and mitosis of F3II cells *in vitro* and *in vivo* (in BALB/c mice) by the same mechanism (Jackson and Singletary,



200

### 201 **3.2.2. Allyl isothiocyanate (AITC):**

202 AITC does not have any effect on the proliferation of MDA-MB-231 cells  
203 (Sayeed et al., 2018) but inhibites MCF-7 cell proliferation in a dose- and time-  
204 dependent manner. This effect can be attributed to the fact that MCF-7 express  
205 estrogen receptors but MDA-MB-231 do not. AITC exhibits toxic effects on the  
206 non-tumorigenic MCF-10A breast cells. This same study also demonstrates  
207 that AITC does not induce cell cycle arrest on MDA-MB-231 cells (Sayeed et  
2082 al., 2018).

0  
8

2092

0  
9

210 Whereas, AITC reduces MDA-MB-468 cell number and promotes G2-M arrest.  
211 The G2-M phase progression is regulated by CDK1 kinases that are activated in  
212 association with cyclin A or cyclin B. The p21/WAF1 is one of the cyclin-  
213 dependent kinase inhibitors, which inhibit cyclin/CDK complexes in the G2/M  
214 phase. The p21/WAF1 has been found to be associated with the growth arrest  
215 in cells. In this study the CDK1 and cyclin B proteins were decreased and  
216 p21/WAF-1 was increased by AITC treatment in a concentration-dependent  
2172 manner (Novio et al., 2016; Tsai et al. 2012)

1  
7

2182

1  
8

### 219 **3.2.3. Erucin:**

220 Erucin inhibits the proliferation and cell cycle arrest of MCF7 breast cancer cells  
221 by suppressing microtubule dynamics (Azarenko et al., 2014). Studies by  
222 Prelowska et al. (2017) demonstrate the same effects in MDA-MB-231, SKBR 3  
223 and T47D breast cancer cell lines. Erucin decreased the viability of all tested





in the G2/M phase by down-regulating the phosphorylation of S6 ribosomal protein in all tested breast cancer cell lines, and reduced HER2 receptor levels in SKBR-3 cells (Prelowska et al., 2017).

#### **3.2.4. Indol-3carbinol (I3C): (Table 3)**

I3C down-regulates the expression of insulin-like Growth Factor Receptor-1 (IGF1R) and Insulin Receptor Substrate-1 (IRS1) in MCF-7 cells. This pathway could explain its effects on the proliferation of hormone-sensitive breast cancer cells. Many studies show that estradiol (E2) has a pro-proliferative activity mediated by an estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). Also, E2 regulates the ER $\alpha$ -mediated expression of IGF1R and IRS1. In ER $\alpha$ -negative cells, there are low level of IGF1R and IRS1 compared to ER $\alpha$ -positive cells. So, I3C can also down-regulates ER $\alpha$  (Marconett et al., 2012). This compound also produces a G1 cell cycle arrest by inhibiting the expression of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT), disrupts binding of endogenous ER $\alpha$  and Sp1 to a composite element within the hTERT promoter and alters estrogen-responsive hTERT expression and Sp1 phosphorylation in MCF-7 cells (Marconett et al., 2011).

This molecule also produces a tyrosine phosphorylation in different types of collection breast cancer cells: MDA-MB-468, MDA-MB-231, MCF-7 and HBL100. This phosphorylation supposes, first, a down-regulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) in all the cells types and, second other changes of proteins of the cell cycle (p21-cip1, CyclinD1, CyclinE, p27Kip1, CDK6)

249 leading to a cell cycle arrest only in MCF7 and MDA-MB-231 cells. Some of



these functions were mediated via phosphorylation of Src (Moiseeva et al., 2007; Firestone et al., 2003; Cram et al., 2001; Cover et al., 1998). This cell cycle arrest is also mediated by an inhibition of CDK2 as demonstrated in MCF-7 cells. I3C treatment induces the formation of a significantly larger 200 kDa CDK2 protein complex that contains a 50 kDa cyclin E and a 75 kDa cyclin E immunoreactive protein. This I3C induced 200 kDa CDK2 protein complex that is enzymatically inactive, localized to the cytoplasm instead in the nucleus where should be the location in proliferating cells (García et al., 2005).

5  
7

5  
8

Other derivative products from I3C like 1-Benzyl-indole-3-carbinol or CTet, a tetrameric derivative, have an enhanced anti-proliferative and anti-estrogenic effect, not only in estrogen responsive cells (MCF-7), but also in estrogen non responsive cells (MDA-MB-231) (Nguyen et al., 2010). The latter product was also tested *in vivo* (De Santi et al., 2011). Other derivative product, CTr (5,6,11,12,17,18-hexahydrocyclonona [1,2-b:4,5-b':7,8-b'']triindole) is an estrogen agonist compound showing a competitive behaviour with estradiol at the estrogen receptor (Riby et al., 2014).

The oncogene cDc25A is overexpressed in multiple cancers and supposed to be an indicator of poor prognosis. It is involved in cell cycle progression. In MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells, and in BALB/c female athymic (nu/nu) mice, I3C induces a decrease of cDc25A (Wu et al., 2010).

7  
1

7  
2

Another form to produce a cell cycle arrest is the up-regulation of interferon

274    gamma ( $\text{IFN}_\gamma$ ). This molecule has well known anti proliferative and apoptotic



275 effects on breast cancer cells. The association of both, I3C and IFN $\gamma$ , produces  
276 a synergistic effect over the cell cycle increasing cell cycle arrest in G1 phase  
2772 by the upregulation of p21 (Chatterji et al., 2004).

7  
7

2782  
7  
8

279 I3C can induce a disruption of the transcription of nuclear factor kappa (NF-KB)  
280 light-chain-enhancer of activated B cells that control cells DNA transcription and  
281 survival. This mechanism is mediated by elastase inhibition transcription. High  
282 levels of elastase correlate with poor prognosis and less survival rate (Aronchik  
283 et al., 2010; Nguyen et al., 2008). This effect is also observed with 3,3'-  
284 Diindolylmethane (DIM), a condensation product from I3C (Rahman and Sarkar,  
2852 2005).

8  
5

2862  
8  
6

287 Cytochrome (CYP) P450 type 1 sysyem is involved in a 4-hydroxylation  
288 involved in the synthesis of potentially carcinogenic catechol estrogens. The  
289 expression of CYP1A and CYP1B gene families is mediated by an aryl  
290 hydrocarbon receptor (AhR). I3C increases the expression of CYP1A, CYP1B  
291 and AhR in MCF7 cells. Ociepa-Zawal et al. (2007) consider that the increase of  
292 the rate CYP1A/CYP1B is the most important estrogen and antiestrogen  
293 mechanism of action of I3C. Before this study, only the action on CYP1A was  
2942 considered for I3C (Tiwari et al., 1994; Ashok et al., 2001).

9  
4

2952  
9  
5

296 I3C activates p21 across increasing p53 in the MCF10A cell line. In almost a  
297 20% of breast cancers, p53 is in a mutant form. In several tumorigenic (T-47D,  
298 SK-Br3) and invasive (MDA-MB-231, MDA-MB-435) cell lines with mutant p53



299 protein, cells are stabilized in G1 phase with I3C treatment. However, in the  
3003 MCF-7 type, this compound did not increase the level of p53 (Brew et al., 2006).

0  
0

3013  
0  
1

### 302 3.2.5 Phenethyl isothiocyanate (PEITC):

303 PEITC interferes with several points in cell cycle promoting cell arrest and  
304 inhibits viability. Heat shock proteins (HSPs) help cells to survive in adverse  
305 conditions, promoting cell survival, but, in breast cancer cells it also plays an  
306 important role in differentiation, invasion, proliferation and metastasis and  
307 becomes a poor prognosis factor (Sarkars et al., 2013). PEITC is an important  
308 down-regulator of HSPs, what means an arrest at G2/M phase in MCF-7 and  
309 MDA-MB-231 cells. It also down-regulates the expression of proteins involved in  
310 G2/M transition, like Cyclin B1, CDK1, CDC25C and PLK-1 in both types of  
3113 cells (Sarkar et al., 2013).

1  
1

3123  
1  
2

313 PEITC up-regulates wild p53 expression in MCF7 cells, but down regulates  
314 mutant p53 in MDA-MB-231 cells and induces an up regulation of p21  
315 irrespective p53 status. PEITC also inhibits NF-KB and its subunits p50 and p65  
3163 (Sarka et al., 2013).

1  
6

3173  
1  
7

### 318 3.3. Apoptotic effect (Figure 1)

319 Apoptosis is the programmed cell death, which has two main mechanisms:  
320 extrinsic and intrinsic pathways. In the former case, the apoptotic signal is



321 activated by a transmembrane receptor (death receptor) like TNF that triggers a  
322 waterfall of events that ends, through the activation of caspase 3 and 7, with the  
323 cell death. In the second case, the stimulus is of intracellular type, like DNA



damage or hypoxia. In this latter pathway, a great family of proteins, having pro-apoptotic functions (i.e. Bax, Bak and Bim) and also anti-apoptotic properties (i.e. Bcl-2, Bcl-xL or Mcl-1). All of them support the mitochondrial membrane balance when it is necessary. Cell death allows the exit of cytochrome-c to join APAF1 and make an apoptosome that finally activate caspases (Elmore, 2007).

2  
8

2  
9

### **3.3.1. Sulforaphane (SFN):**

SFN induces apoptotic cell death in four cellular lines (MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7 and T47D). In MDA-MB-231, it activates the extrinsic pathway, increasing FAS, caspase 3 and 8, but not caspase 9 activity. In these cells, Bcl2 as well the localization of cytochrome c are not altered. However, in the other three cellular types, the intrinsic pathway is activated by cleavage of PARP, stimulate caspase 3 and 9, but not 8, and allows cytochrome c exit from mitochondria (Pledge-Tracy et al., 2007).

3  
7

3  
8

However, other studies report the activation of both pathways and, to explain it, they consider changes in HSP. HSPs are molecules that are involved in both types of apoptosis and are affected also by SFN. These proteins are up regulated in breast cancer cells (MCF7, and MDA-MB-231) and SFN reduces their expression, specially HSP 27, 70 and 90. These mechanisms, that involve both pathways, are supposed to up regulate some proteins like Apaf-1, Bax, Bad, cytochrome c and caspase 3, 8 and 9. However, the degree of elevation of caspase 8 is not so significant than the other, what leads to consider the intrinsic pathway should be more important a down regulation in Bcl2 an

348 apoptotic mechanism (Kanematsu et al., 2010; Sarkar et al., 2012,).



349

350 It is also important take into account the benefits derived of the concomitant  
351 treatment with others chemotherapy agents like doxorubicin. These agents  
352 reduce their efficacy when p53 is in a mutant form [p53(Ser220)]. Nevertheless,  
353 when combined with SFN, this compound restores chemotherapeutic agent  
354 3 sensitivity and induces apoptosis via intrinsic pathway (Fimognari et al., 2006).

5  
4

355 3  
5  
5

### 356 **3.3.2. Allyl isothiocyanate (AITC)**

357 AITC produces apoptosis in MCF-7 cells and, in a lower degree, in MDA-MB-  
358 231 cells. This compound also induces ROS (reactive oxygen species)  
359 production in both types of cells. Decrease in mitochondrial membrane  
360 potentials in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, what triggers the release of  
361 cythochrome c, increase in Bax and decrease in Bcl2 are found. Subsequently,  
362 increased caspase 9 activity is also found, but does not significantly alter  
363 caspase 3 activity in MCF-7 cells. In MDA-MB-231 cells, AITC increases  
364 caspase 3 activity but does not significantly alter caspase 9 activity. For the  
365 latter, AITC induces an increase on the activity of PARP (Poly ADP ribose  
366 polymerase) what means an increase on cell death (Bo et al., 2016). The same  
367 3 findings are seen in MDA-MB-468 cells (Tsai et al., 2012).

6  
7

368 3  
6  
8

### 369 **3.3.3 Erucin**

370 This compound has anti-estrogen effects (Pawlik et al., 2016). Antiestrogens  
371 are usually used estrogen receptor positive (ER+) cancers but, in some cases,

372 by different mechanisms, resistance to the hormone therapy can arise. In

373 addition, this drug it is not without secondary effects.  
374



374

375 Erucin induces death cell and also potentiates the effect of tamoxifen in MCF-7,  
376 T47D and BT-474. A consistent effect occurs with molecules involved on the  
377 apoptosis mechanism, such as PARP, Bcl2 and Bax. Some of these beneficial  
378 effects of erucin on these apoptotic pathways are maintained in tamoxifen-  
3793 resistant cells (Pawlik et al., 2016).

7  
9

3803  
8  
0

381 Erucin also exhibits an anti HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2)  
382 action. An over production of this receptor is seen in almost a quarter of all the  
383 breast cancer and the enhanced signal from this receptor produces an evasion  
384 from apoptosis among other mechanisms. The most commonly used drugs for  
385 this type of tumour are trastuzumab and lapatinib. When combined with erucin,  
386 the pro-apoptotic effect of these drugs is enhanced and, surprisingly, promotes  
387 apoptosis in SKBR-3 cells (Kaczyńska et al., 2016; Kaczyńska and Herman-  
3883 Antosiewicz, 2017;; Prełowska et al., 2017).

8  
8

3893  
8  
9

390 Erucin also induces apoptosis enhancing the mitochondrial translocation of  
391 cofilin and Drp1. In MCF-7 and MDA-MB-231 cells, this compound increases  
392 the level of cofilin and Drp1 inside the mitochondria and decreases it in cytosol

3933 395395  
9  
3 396396

3943  
9  
4

(Li et al., 2015).

**397 3.3.4. Indole -3- carbinol (I3C) (Figure 2):**



398 One of the ways I3C can induce apoptosis is by the inhibition of NF- $\kappa$ B  
399 activation that has an anti-apoptotic role in the nucleus mediated via inhibition of  
400 Akt phosphorylation. This pathway is activated by several growth factors in  
401 MCF10A-derived cell lines with premalignant (DCIS) and malignant (CA1a)  
402 phenotypes, but not in non tumorigenic MCF10A human breast epithelial cells  
403 (Rahman and Sarkar, 2004; 2005). So, apoptosis occurs in tumorigenic cells  
404 but not in normal cells (Rahman et al., 2003).

0  
4

4054  
0  
5

406 I3C has another main apoptotic mechanism inhibiting Akt that inhibits BAD, Bax  
407 and Bcl2 increasing cell proliferation (Popolo et al., 2017). Akt inhibits bad  
408 translocation inside the mitochondria to avoid apoptosis in breast cancer cells  
409 but, in cells treated with I3C, this translocation is enhanced (Rahman et al.,  
410 2000). I3C apoptotic effects are also secondary to the down regulation of Bcl2  
411 and an up regulation in the release of cythochrome c and apoptosome formation  
4124 (Hong et al, 2002; Sarkar and Rahman, 2003;).

1  
2

4134  
1  
3

414 In ER positive cancer cells, I3C inhibits ER $\alpha$  and EGFR and, in ER negative  
415 cancer cells, inhibits EGFR, being this effect more intense in the former ones  
4164 (Caruso et al., 2014, Moiseeva et al., 2007, Popolo et al., 2017).

1  
6

4174  
1  
7

418 In female mice bearing breast cancer, single treatment with I3C inhibits NF-KB  
419 and in a significant manner, and also potentiates the effect of doxorubicin in



420 both parameters (Hajra et al., 2018). Doxorubicin it is a very cardiotoxic drug,  
421 because it increases ROS and induces the production of pro-inflammatory  
422 products like COX in cardiac cells. Association with I3C may then let reduce the



423 dose of doxorubicin to obtain the same anti-cancer effects with less cardiaca  
4244 damage (Hajra et al., 2018).

2  
4

4254  
2  
5

### 426 3.3.5. Phenethyl isothiocyanate (PEITC):

427 PEITC treatment in BRI-JM04, MCF7, and MDA-MB-231 cells enhances the  
428 apoptotic mechanisms of proapoptotic molecules like Bak, Bax, Bim (B-cell  
429 lymphoma type 2 interacting mediator of cell death) and PUMA (p53  
430 upregulated modulator of apoptosis) and inhibits the anti apoptotic molecules  
431 like Bcl2 and Bcl-xL (Lee and Cho, 2008; Hahm and Singh, 2012;). This effect is  
432 also observed in MCF7 and MDA-MB-231 cells stably transfected with HER-2 in  
433 both *in vitro* and *in vivo* assays (Gupta and Srivastava, 2012; Sing et al., 2012).  
434 Other mechanism is the potent inhibition of HSP 27, 70 and 90 what supposes  
435 the activation of caspase 9 and 3 in MCF7 and MDA-MB- 231 cells (Sarkars et  
4364 al., 2013).

3  
6

4374  
3  
7

438 MDA-MB-231 cells are more sensitive to apoptosis by PEITC than MCF7. The  
439 reason should be that they have less basal level of ROS and less capacity of  
4404 adaptation to antioxidants than MCF7 cells (Syed Alwi et al., 2012).

4  
0

4414  
4  
1

442 For last, treatment with PEITC enhances the expression of seven suppressor

4434 3

4

444444

4454 genes (p53, ATF-2, hsp27, BRCA2, IL2, p57, and CYP19) (Moon et al., 2011).  
4  
5

4464  
4  
6

#### 447 3.3.6. Benzyl isothiocyanate (BITC)



The RON receptor is expressed in a full-length (5 kb) and truncated forms (2 kb, sfRON) in breast cancer. This receptor is poorly understood but, in breast cancer cells, overexpression of RON is associated to an increased number of metastasis (Sehrawat and Singh, 2015; Rao, 2013; Xiao et al., 2006). Cells with sfRON (MCF7 and MDA-MB-361) treated with BITC, have a more active up-regulation of Bad and Bax than those without this type of receptor (Rao, 2013; Sehrawat and Singh, 2015,). Upregulation of pro-apoptotic proteins and down regulation of anti-apoptotic proteins induced by this compound have been seen in MCF7 and MDA-MB-231 cells (Xiao et al., 2006).

This molecule also produces apoptosis mediated by ROS in MDA-MB-231 and MCF7 cells due to inhibition of complex III of the mitochondrial respiratory chain and, finally, activating the intrinsic pathway (Xiao et al., 2008). It also produces apoptosis of breast cancer stem cells *in vitro* with MCF7 and SUM159 cells and *in vivo* with MMTV-neu transgenic mice (Kim et al., 2013).

BITC also inhibits other p53-induced elevations of anti apoptotic proteins like cIAP1, XIAP and survivin, in MCF7 and MDA-MB-231 cells under *in vitro* conditions and *in vivo* (Kim and Singh, 2010).

### 3.4. Inhibition of migration and metastasis: (Table 4)

Breast cancer cells have epithelial characteristics like columnar shape with cell-

470 cell adhesion due to apico-basolateral polarization and due to proteins like E-  
471 cadherin or occludin (Scheel and Weinberg, 2012). When the cells decide to  
472 migrate, they initiate an epithelial to mesenchymal transition (EMT) altering their



473 surface into a spindle shape, losing their adhesion and their polarization, and  
474 changing their main proteins to vimentin, N-cadherin, metalloproteinases (MMP)  
475 and fibronectin. In the secondary site cells have to change again to epithelial  
4764 from mesenchymal (Scheel and Weinberg, 2012).

7  
6

4774  
7  
7

478 This capacity of breast cancer as well as other solid tumor cells to migrate  
479 becomes a serious potential risk, because the main part of the deaths due to  
4804 breast cancer are in patients with metastasis.

8  
0

4814  
8  
1

#### 482 **3.4.1. Sulphoraphane (SFN)**

483 SFN decreases vimentin in dose- and time-manner in MDA-MB-231 cells.  
484 MMPs are proteins secreted by breast cancer cells to digest extracellular  
485 matrix, so are very important in the EMT. SFN decreases the activity of MMP14  
486 and MMP7, but other MMPs remain stable (Hunakova et al., 2009). SFN also  
487 inhibits the Hedgehog pathway that has been suggested play an important role  
488 in the migration and metastasis of breast cancer cells. This pathway, at last,  
489 induces the activation of MMP 2 and 9, which are clearly inhibited by SFN (Bao  
4904 et al., 2016).

9  
0

4914  
9  
1

492 It is quite good establish the relationship between breast cancer and obesity.  
493 For example, SFN inhibits leptin, a key mediator that enhances migration and

4954 invasion of MCF7 and MDA-MB-231 cells (Kim et al., 2011).  
9  
5

4964  
9  
6

**497 3.4.2. Indol-3-Carbinol (I3C)**



I3C inhibits migration and metastasis by up regulation of E-cadherin and the tumour suppressors genes like PTEN and BRCA1 in T47-D, MCF7 and MDA-MB 468 cells (Meng et al., 2000a; 2000B). It also inhibits MUC1, a protein associated with poor prognosis in MCF7 and MDA-MB-468 cells (Lee et al., 2004). So the mechanism for which I3C inhibits EMT is independent on the estrogen receptor.

0  
3

0  
4

### 3.4.3. Phenethyl isothiocyanate (PEITC)

It is a surprise to know that PEITC does not cause the suppression of EMT. Instead, under *in vitro* conditions, PEITC increases vimentin in MDA-MB-231 cells. Nevertheless, *in vivo* studies with MMTV-*neu* mice, showed that PEITC decreases vimentin level what is supposed to produce inhibition of EMT (Sakao et al., 2013).

1  
0

1  
1

### 3.4.4. Benzyl isothiocyanate (BITC)

BITC produces inhibition of EMT on *in vitro* and *in vivo* studies. BITC increases E-cadherin expression in MDA-MB-231 (epithelial) and SUM159 (mesenchimal) cells, which have very low amount of this protein, and decreases vimentin and snail in both (Sehrawat and Singh, 2011; Sehrawat et al., 2013). It also happens in MCF7 cells but, in this case, the increase of E- cadherin is not so significant because these cells have more quantity of this protein. On *In vivo* studies using

20

1  
9



fem ale athymic mice, BITC increases E- cadherin and decreases vimentin.

521 BITC treatment also causes the suppression of *uPA* and *uPAR* levels in MDA-

522 MB-231, SUM159 and MDA-MB-468 cells. It is known that the overexpression



of uPA (urokinase-type plasminogen activator) and uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor), are mechanisms of proteolysis of extracellular matrix, they suppose the starting point of EMT. A similar effect occurs with FOXQ1, that it is also decreased with BITC in these cells (Sehrawat et al., 2013). This molecule was tested on BALB/C-nu/nu female mice implanted with MDA-MB-231 and MCF7 cells to confirm the inhibition of breast cancer-induced osteolytic bone resorption. In some mice, a complete regression of the bone metastasis occurs (Sehrawat et al., 2013). Also, in female BALB/c mice, it reduced the pulmonary tumour nodule formation, as well as VEGF, and MMP2 and 9 production (Pore et al., 2018). As well as SFN, BITC inhibits the action of leptin (Kim et al., 2011).

3  
3

3  
4

### **3.5. Autophagy.**

This is the so-called cell death-type II, different to cell death type I, that it is apoptosis. It is a mechanism that happens in normal and tumoral cells, when their vitality is attacked and starts to degrade its organelles and proteins. In breast cancer, it has been recently demonstrated that this mechanism allows cells to survive like dormant cells (Vera-Ramirez et al., 2018). However, there is a controversial if autophagy causes death or protect the cell (Kondo and Kondo, 2006). Several oncological treatments, like tamoxifen, amsacrine, temozolomide, etoposide, are inducers of autophagic cell death.

4  
3

4  
4

SFN induces autophagy in MDA-MB-231 cells, producing numerous autophagosomes and autolysosomes in the cytoplasm (Kanematsu et al.,

2010). A synergistic effect with 5-flouracil on this parameter has also been found (Milczarek et al., 2018; Chirumbolo and Bjørklund, 2018).

BITC produces several effects on migration and metastasis, including the appearance of double-membrane vacuoles and acidic vesicular organelles, as well as cleavage of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) in MDA-MB-231, MCF-7, MDA-MB-468, BT-474, and BRI-JM04 and MDA-MB-231 xenografts (cita). When they inhibit autophagy, an inhibitory effect on cell growth is also found; therefore, autophagy seems to limit cell growth. Serine-threonine kinase mTOR is a negative regulator of autophagy and is inhibited by BITC (Xiao et al., 2012).

### 3.6. Antiangiogenic effect.

PEITC has an antiangiogenic effect demonstrated under *in vivo* conditions in female Sprague Dawley rats, showing a decreased ability of intratumoral capillary vessels formation in a breast cancer model (Aras et al., 2013). This effect maybe due to a reduction of 4E-BP1 (regulator 4E binding protein 1) phosphorylation, a regulator of angiogenesis (Syed Alwi et al., 2010).

SFN suppresses endothelial cell proliferation in female Balb/c mice (Jackson et al., 2007). BITC and I3C also inhibit VEGF (vascular endothelial growth factor) both *in vivo* and *in vitro* (Warin et al., 2010; Hajra et al., 2018). Diindolylmethane

569 (DIM), the condensation product from I3C, also inhibits angiogenesis on *in vivo*  
5705 assays (Chang et al., 2005).

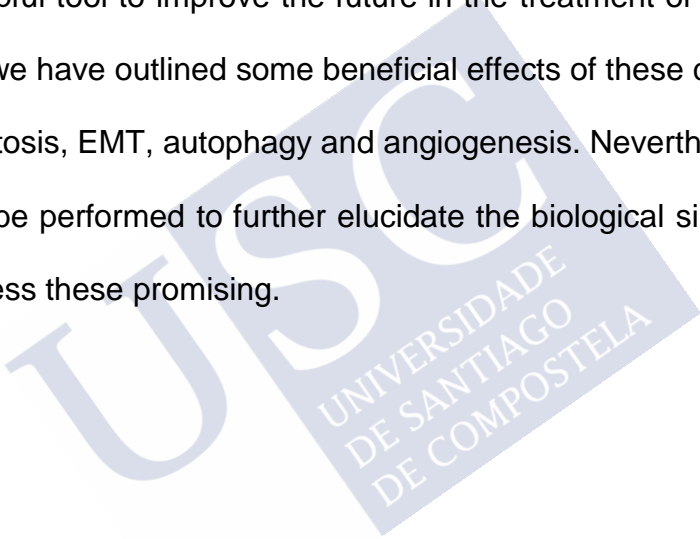
7  
0

5715  
7  
1



#### 572 4. Conclusions.

573 Breast cancer is the most frequent tumour in European Union. Screening  
574 programs as well as diagnostic and therapeutic improvements have increased  
575 breast cancer survival rates to 80% at 5 years term. However, it continues to  
576 be the most lethal tumour in women over 20 years of age, side effects of current  
577 treatments that are sometimes unacceptable, and resistency to chemotherapy  
578 makes necessary to discover new compounds. At this respect, ITCs from  
579 cruciferous vegetables, with apparently not significant adverse effects, may  
580 constitute a helpful tool to improve the future in the treatment of breast cancer.  
581 In this review, we have outlined some beneficial effects of these compounds on  
582 cell cycle, apoptosis, EMT, autophagy and angiogenesis. Nevertheless, more  
583 studies should be performed to further elucidate the biological significance and  
584 health relatedness these promising.

A large, light blue watermark of the USC logo is positioned diagonally across the lower half of the page. The logo consists of the letters 'USC' in a large, stylized font, with the text 'UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA' written in a smaller, sans-serif font below it.

## REFERENCES

Aras, U., Gandhi, Y.A., Masso-Welch, P.A., Morris, M.E. (2013) Chemopreventive and anti-angiogenic effects of dietary phenethyl isothiocyanate in an N-methyl nitrosourea-induced breast cancer animal model. *Biopharm. Drug Dispos.* 34(2):98-106.

Aronchik, I., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. (2010) Direct inhibition of elastase activity by indole-3-carbinol triggers a CD40-TRAF regulatory cascade that disrupts NF-kappaB transcriptional activity in human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 70(12): 4961-4971.

Ashok, B.T., Chen, Y., Liu, X., Bradlow, H.L., Mittelman, A., Tiwari, R.K. (2001) Abrogation of estrogen-mediated cellular and biochemical effects by indole-3-carbinol. *Nutr. Cancer.* 41(1-2):180-187.

Atwell, L.L., Zhang, Z., Mori, M., Farris, P., Vetto, J.T., Naik, A.M., Oh, K.Y., Thuillier, P., Ho, E., Shannon, J. (2015) Sulforaphane bioavailability and chemopreventive activity in women scheduled for breast biopsy. *Cancer Prev. Res. (Phila)* 8(12):1184-1191.

Azarenko, O., Jordan, M.A., Wilson, L. (2014) Erucin, the major isothiocyanate in arugula (*Eruca sativa*), inhibits proliferation of MCF7 tumor cells by suppressing microtubule dynamics. *PLoS One.* 20,9(6): 100599.

Azarenko, O., Okouneva, T., Singletary, K.W., Jordan, M.A., Wilson, L. (2008) Suppression of microtubule dynamic instability and turnover in MCF7 breast cancer cells by sulforaphane. *Carcinogenesis.* 29(12): 2360-2368.

- Bao, C., Kim, M.C., Chen, J., Song, J., Ko, H.W., Lee, H.J. (2016) Sulforaphene Interferes with Human Breast Cancer Cell Migration and Invasion through Inhibition of Hedgehog Signaling. *J. Agric. Food Chem.* 64(27): 5515-5524.
- Barnum, K.J., O'Connell, M.J. (2014) Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods Mol. Biol.* 1170: 29–40.
- Bo, P., Lien, J.C., Chen, Y.Y., Yu, F.S., Lu, H.F., Yu, C.S., Chou, Y.C., Yu, C.C., Chung, J.G. (2016) Allyl Isothiocyanate Induces Cell Toxicity by Multiple Pathways in Human Breast Cancer Cells. *Am. J. Chin. Med.* 44(2): 415-437.
- Boyanapalli, S.S., Li, W.1, Fuentes, F., Guo, Y., Ramirez, C.N., Gonzalez, X.P., Pung, D., Kong, A.N. (2016) Epigenetic reactivation of RASSF1A by phenethyl isothiocyanate (PEITC) and promotion of apoptosis in LNCaP cells. *Pharmacol. Res.* 114: 175-184.
- Brew, C.T., Aronchiks I., Hsu, J.C., Sheen, J.H., Dickson, R.B., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. (2006) Indole-3-carbinol activates the ATM signaling pathway independent of DNA damage to stabilize p53 and induce G1 arrest of human mammary epithelial cells. *Int. J. Cancer.* 118(4):857-868.
- Cade, J.E., Taylor, E.F., Burley, V.J., Greenwood, D.C. (2011) Does the Mediterranean dietary pattern or the Healthy Diet Index influence the risk of breast cancer in a large British cohort of women? *Eur. J. Clin. Nutr.* 65(8): 920-928 (doi: 10.1038/ejcn.2011.69).
- Caldon, C.E., Daly, R.J., Sutherland, R.L., Musgrove, E.A. (2006) Cell cycle control in breast cancer cells. *J. Cell Biochem.* 97(2): 261-274.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. (2012) *Nature*, 490: 61–70 .

Cang, S., Ma, Y., Chiao, J.W., Liu, D. (2014) Phenethyl isothiocyanate and paclitaxel synergistically enhanced apoptosis and alpha-tubulin hyperacetylation in breast cancer cells. *Exp. Hematol. Oncol.* 3(1): 5.

Capuano, E., Dekker M., Verkerk R., Oliviero T. (2017) Food as Pharma? The Case of Glucosinolates. *Curr. Pharm. Des.* 23(19):2697-2721.

Caruso, J.A., Campana, R., Wei, C., Su, C.H., Hanks, A.M., Bornmann, W.G., Keyomarsi, K. (2014) Indole-3-carbinol and its N-alkoxy derivatives preferentially target ER $\alpha$ -positive breast cancer cells. *Cell Cycle*. 13(16): 2587-99.

Chang, X., Tou, J.C., Hong, C., Kim, H.A., Riby, J.E., Firestone, G.L., Bjeldanes, L.F. (2005) 3,3'-Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice. *Carcinogenesis*. 26(4): 771-778.

Chatterji, U., Riby, J.E., Taniguchi, T., Bjeldanes, E.L., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. (2004) Indole-3-carbinol stimulates transcription of the interferon gamma receptor 1 gene and augments interferon responsiveness in human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 25(7): 1119-1128.

Chirumbolo, S., Bjørklund, G. (2018) Sulforaphane and 5-fluorouracil synergistically inducing autophagy in breast cancer: A possible role for the Nrf2-Keap1-ARE signaling?. *Food Chem. Toxicol.* 112:414-415.

Cover, C.M., Hsieh, S.J., Tran, S.H., Hallden, G., Kim, G.S., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. (1998) Indole-3-carbinol inhibits the expression of cyclin-



dependent kinase-6 and induces a G1 cell cycle arrest of human breast cancer cells independent of estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 273(7): 3838-3847.

Cram, E.J., Liu, B.D., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. (2001) Indole-3-carbinol inhibits CDK6 expression in human MCF-7 breast cancer cells by disrupting Sp1 transcription factor interactions with a composite element in the CDK6 gene promoter. *J. Biol. Chem.* 276(25): 22332-22340.

De Santi, M., Galluzzi, L., Lucarini, S., Paoletti, M.F., Fraternale, A., Duranti, A., De Marco, C., Fanelli, M., Zaffaroni, N., Brandi, G., Magnani, M. (2011) The indole-3-carbinol cyclic tetrameric derivative CTet inhibits cell proliferation via overexpression of p21/CDKN1A in both estrogen receptor-positive and triple-negative breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res.* 13(2):R33.

Degner, S.C., Papoutsis, A.J., Selmin, O., Romagnolo, D.F. (2009) Targeting of aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of cyclooxygenase-2 expression by the indole-3-carbinol metabolite 3,3'-diindolylmethane in breast cancer cells. *J. Nutr.* 139(1): 26-32.

Dumitrescu, R.G. (2018) Interplay Between Genetic and Epigenetic Changes in Breast Cancer Subtypes. *Methods Mol. Biol.* 1856: 19-34.

Elmore, S. (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35(4): 495–516.

Farsinejad-Marj, M., Talebi, S., Ghiyasvand, R., Miraghajani, M. (2015) Adherence to Mediterranean diet and risk of breast cancer in premenopausal and postmenopausal women. *Arch. Iran Med.* 18(11):786-792.

Fimognari, C., Nüsse, M., Lenzi, M., Sciuscio, D., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P. (2006) Sulforaphane increases the efficacy of doxorubicin in mouse fibroblasts characterized by p53 mutations. *Mutat. Res.* 601(1-2): 92-101.

Firestone, G.L., Bjeldanes, L.F. (2003) Indole-3-carbinol and 3-3'-diindolylmethane antiproliferative signaling pathways control cell-cycle gene transcription in human breast cancer cells by regulating promoter-Sp1 transcription factor interactions. *J. Nutr.* 133(7 Suppl): 2448S-2455S.

Garcia, H.H., Brar, G.A., Nguyen, D.H., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. (2005) Indole-3-carbinol (I3C) inhibits cyclin-dependent kinase-2 function in human breast cancer cells by regulating the size distribution, associated cyclin E forms, and subcellular localization of the CDK2 protein complex. *J. Biol. Chem.* 280(10): 8756-8764.

Gianfredi, V., Vannini, S., Moretti, M., Villarini, M., Bragazzi, N.L., Izzotti, A., Nucci, D. (2017) Sulforaphane and Epigallocatechin Gallate Restore Estrogen Receptor Expression by Modulating Epigenetic Events in the Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics.* 10(3-4): 126-135.

Gupta, P., Srivastava, S.K. (2012) Antitumor activity of phenethyl isothiocyanate in HER-2-positive breast cancer models. *BMC Med.* 10: 80.

Hahm, E.R., Singh, S.V. (2012) Bim contributes to phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis in breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* 51(6):465-474.

Hajra, S., Patra, A.R., Basu, A., Saha, P., Bhattacharya, S. (2018) Indole-3-Carbinol (I3C) enhances the sensitivity of murine breast

adenocarcinoma cells to doxorubicin (DOX) through inhibition of NF- $\kappa$ B, blocking angiogenesis and regulation of mitochondrial apoptotic pathway.

*Chem. Biol. Interact.* 290:19-36

Higdon, J.V., Delage, B., Williams, D.E., Roderick, H. (2007) Dashwood. Cruciferous Vegetables and Human Cancer Risk: Epidemiologic Evidence and Mechanistic Basis. *Pharmacol. Res.* 55(3): 224–236.

Hong, C., Firestone, G.L., Bjeldanes, L.F. (2002) Bcl-2 family-mediated apoptotic effects of 3,3'-diindolylmethane (DIM) in human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 15,63(6):1085-97.

Hunakova, L., Sedlakova, O., Cholujska, D., Grunesova, P., Duraj, J., Sedlak, J. (2009) Modulation of markers associated with aggressive phenotype in MDA-MB-231 breast carcinoma cells by sulforaphane. *Neoplasma.* 56(6): 548-556.

Jackson, S.J., Singletary, K. W., Venema, R.C. (2007) Sulforaphane suppresses angiogenesis and disrupts endothelial mitotic progression and microtubule polymerization. *Vascul. Pharmacol.* 46(2): 77-84

Jackson, S.J., Singletary, K.W. (2004a) Sulforaphane inhibits human MCF-7 mammary cancer cell mitotic progression and tubulin polymerization. *J. Nutr.* 134(9): 2229-2236.

Jackson, S.J., Singletary, K.W.(2004b) Sulforaphane: a naturally occurring mammary carcinoma mitotic inhibitor, which disrupts tubulin polymerization. *Carcinogenesis.* 25(2): 219-227

Kaczyńska, A.(2015) Combination of lapatinib with isothiocyanates overcomes drug resistance and inhibits migration of HER-2 positive breast

cancer cells Świerczyńska J, Herman-Antosiewicz A. Sensitization of HER-2 Positive Breast Cancer Cells to Lapatinib Using Plants-Derived Isothiocyanates. *Nutr. Cancer*. 67(6): 976-86.

Kaczyńska, A., Herman-Antosiewicz, A. (2017) Combination of lapatinib with isothiocyanates overcomes drug resistance and inhibits migration of HER-2 positive breast cancer cells. *Breast Cancer*. 24(2): 271-280.

Kanematsu, S., Uehara, N., Miki, H., Yoshizawa, K., Kawanaka, A., Yuri, T., Tsubura, A. (2010) Autophagy inhibition enhances sulforaphane-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Anticancer Res*. (9): 3381-3390.

Kanematsu, S., Uehara, N., Miki, H., Yoshizawa, K., Kawanaka, A., Yuri, T., Tsubura, A. (2010) Autophagy inhibition enhances sulforaphane-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Anticancer Res*. 30(9): 3381-3390.

Kim, E.J., Hong, J.E., Eom, S.J., Lee, J.Y., Park, J.H. (2011B) Oral administration of benzyl-isothiocyanate inhibits solid tumor growth and lung metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells in BALB/c mice. *Breast Cancer Res. Treat*. 130(1): 61-71.

Kim, S.H., Sehrawat, A., Singh, S.V. (2013) Dietary chemopreventative benzyl isothiocyanate inhibits breast cancer stem cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. 6(8):782-790

Kim, S.H., Singh, S.V. (2010) p53-Independent apoptosis by benzyl isothiocyanate in human breast cancer cells is mediated by suppression of XIAP expression. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. 3(6):718-726.

Kim, S.H., Nagalingam, A., Saxena, N.K., Singh, S.V., Sharma, D. (2011) Benzyl isothiocyanate inhibits oncogenic actions of leptin in human

breast cancer cells by suppressing activation of signal transducer and activator of transcription 3. *Carcinogenesis*. 32(3): 359-367.

Kondo, Y., Kondo, S. (2006) Autophagy and cancer therapy. *Autophagy*. 2(2): 85-90.

Lee, I.J., Han, F., Baek, J., Hisatsune, A., Kim, K.C. (2004) Inhibition of MUC1 expression by indole-3-carbinol. *Int. J. Cancer*. 109(6): 810-816.

Lee, J.W., Cho, M.K. (2008) Phenethyl isothiocyanate induced apoptosis via down-regulation of Bcl-2/XIAP and triggering of the mitochondrial pathway in MCF-7 cells. *Arch. Pharm. Res.* 31(12):1604-1612.

Lewinska, A., Adamczyk-Grochala, J., Derebowska, A., Wnuk, M.(2017) Sulforaphane-Induced Cell Cycle Arrest and Senescence are accompanied by DNA Hypomethylation and Changes in microRNA Profile in Breast Cancer Cells. *Theranostics*., 15,7(14):3461-3477.

Li, G., Zhou, J., Budhraj, A., Hu, X., Chen, Y., Cheng, Q., Liu, L., Zhou, T., Li, P., Liu, E., Gao, N. (2015) Mitochondrial translocation and interaction of cofilin and Drp1 are required for erucin-induced mitochondrial fission and apoptosis. *Oncotarget*. 30,6(3):1834-1849.

Li, Y., Buckhaults, P., Li, S., Tollefsbol, T. (2018) Temporal Efficacy of a Sulforaphane-Based Broccoli Sprout Diet in Prevention of Breast Cancer through Modulation of Epigenetic Mechanisms. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. 11(8): 451-464

Liu, K., Cang, S., Ma, Y., Chiao, J.W. (2013) Synergistic effect of paclitaxel and epigenetic agent phenethyl isothiocyanate on growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Cell. Int.* 13(1): 10.

López-Guarnido, O., Álvarez-Cubero, M.J., Saiz, M., Lozano, D., Rodrigo, L., Pascual, M., Cozar, J.M., Rivas, (2014) A.. Mediterranean diet adherence and prostate cancer risk. *Nutr. Hosp.* 31(3):1012-1019.

Marconett, C.N., Sundar, S.N., Tseng, M., Tin, A.S., Tran, K.Q., Mahuron, K.M., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. (2011) Indole-3-carbinol downregulation of telomerase gene expression requires the inhibition of estrogen receptor-alpha and Sp1 transcription factor interactions within the hTERT promoter and mediates the G1 cell cycle arrest of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 32(9): 1315-1323.

Marconett, CN., Singhal, A.K., Sundar, S.N., Firestone, G.L. (2012) Indole-3-carbinol disrupts estrogen receptor-alpha dependent expression of insulin-like growth factor-1 receptor and insulin receptor substrate-1 and proliferation of human breast cancer cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 363(1-2): 74-84.

Meeran, S.M., Patel, S.N., Tollefsbol, T.O. (2010) Sulforaphane causes epigenetic repression of hTERT expression in human breast cancer cell lines. *PLoS One*. 5(7): e11457.

Meng, Q., Goldberg, I.D., Rosen, E.M., Fan, S. (2000a) Inhibitory effects of Indole-3-carbinol on invasion and migration in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 63(2): 147-152.

Meng, Q., Qi, M., Chen, D.Z., Yuan, R., Goldberg, I.D., Rosen, E.M., Auburn, K., Fan, S. (2000b) Suppression of breast cancer invasion and migration by indole-3-carbinol: associated with up-regulation of BRCA1 and E-cadherin/catenin complexes. *J. Mol. Med (Berl)*. 78(3): 155-165.

Milczarek, M., Wiktorska, K., Mielczarek, L., Koronkiewicz, M., Dąbrowska, A., Lubelska, K., Matosiuk, D., Chilmonczyk, Z. (2018) Autophagic cell death and premature senescence: New mechanism of 5-fluorouracil and sulforaphane synergistic anticancer effect in MDA-MB-231 triple negative breast cancer cell line. *Food Chem. Toxicol.* 111: 1-8.

Moiseeva, E.P., Heukers, R., Manson, M.M. (2007) EGFR and Src are involved in indole-3-carbinol-induced death and cell cycle arrest of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 28(2): 435-445.

Moon, Y.J., Brazeau, D.A., Morris, M.E. (2011) Dietary phenethyl isothiocyanate alters gene expression in human breast cancer cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*

Nguyen, H.H., Aronchik, I., Brar, G.A., Nguyen, D.H., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L. (2008) The dietary phytochemical indole-3-carbinol is a natural elastase enzymatic inhibitor that disrupts cyclin E protein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105(50): 19750-19755.

Nguyen, H.H., Lavrenov, S.N., Sundar, S.N., Nguyen, D.H., Tseng, M., Marconett, C.N., Kung, J., Staub, R.E. Preobrazhenskaya MN, Bjeldanes LF, Firestone GL. (2010) 1-Benzyl-indole-3-carbinol is a novel indole-3-carbinol derivative with significantly enhanced potency of anti-proliferative and anti-estrogenic properties in human breast cancer cells. *Chem. Biol. Interact.* 186(3): 255-266

Novío, S., Cartea, E., Soengas, P., Freire-Garabal, M., Núñez-Iglesias, M.J. (2016) Effects of Brassicaceae Isothiocyanates on Prostate Cancer. *Molecules*. 21(5): 626.

Ociepa-Zawal, M., Rubiś, B., Laciński, M., Trzeciak, W.H. (2007) The effect of indole-3-carbinol on the expression of CYP1A1, CYP1B1 and AhR genes and proliferation of MCF-7 cells. *Acta Biochim. Pol.* 54(1):113-117

Pawlik, A., Słomińska-Wojewódzka, M., Herman-Antosiewicz, A. (2016) Sensitization of estrogen receptor-positive breast cancer cell lines to 4-hydroxytamoxifen by isothiocyanates present in cruciferous plants. *Eur. J. Nutr.* 55(3): 1165-1180.

Pledgie-Tracy, A., Sobolewski, M.D., Davidson, N.E. (2007) Sulforaphane induces cell type-specific apoptosis in human breast cancer cell lines. *Mol. Cancer Ther.* 6(3): 1013-1021.

Popolo, A., Pinto, A., Daglia, M., Nabavi, S.F., Farooqi, A.A., Rastrelli, L. (2017) Two likely targets for the anti-cancer effect of indole derivatives from cruciferous vegetables: PI3K/Akt/mTOR signalling pathway and the aryl hydrocarbon receptor. *Semin. Cancer Biol.* 46:132-137.

Pore, S.K., Hahm, E.R., Latoche, J.D., Anderson, C.J., Shuai, Y., Singh, S.V. (2018) Prevention of breast cancer-induced osteolytic bone resorption by benzyl isothiocyanate. *Carcinogenesis.* 39(2): 134-145.

Prełowska, M., Kaczyńska, A., Herman-Antosiewicz, A. (2017) 4-(Methylthio)butyl isothiocyanate inhibits the proliferation of breast cancer cells with different receptor status. *Pharmacol. Rep.* 69(5): 1059-1066.

Rahman, K.M., Aranha, O., Glazyrin, A., Chinni, S.R., Sarkar, F.H. (2000) Translocation of Bax to mitochondria induces apoptotic cell death in indole-3-carbinol (I3C) treated breast cancer cells. *Oncogene.* 19(50):5764-71.



Rahman, K.M., Aranha, O., Sarkar, F.H. (2003) Indole-3-carbinol (I3C) induces apoptosis in tumorigenic but not in nontumorigenic breast epithelial cells. *Nutr. Cancer*. 45(1): 101-112.

Rahman, K.M., Li, Y., Sarkar, F.H. (2004) Inactivation of akt and NF-kappaB play important roles during indole-3-carbinol-induced apoptosis in breast cancer cells. *Nutr. Cancer*. 48(1): 84-94.

Rahman, K.W., Sarkar, F.H. (2005) Inhibition of nuclear translocation of nuclear factor-kappaB contributes to 3,3'-diindolylmethane-induced apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res*. 65(1): 364-371.

Rao, C.V. (2013) Benzyl isothiocyanate: double trouble for breast cancer cells. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. 6(8): 760-763.

Riby, J.E., Feng, C., Chang, Y.C., Schaldach, C.M., Firestone, G.L., Bjeldanes, L.F. (2000) The major cyclic trimeric product of indole-3-carbinol is a strong agonist of the estrogen receptor signaling pathway. *Biochemistry*. 39(5): 910-918.

Sakao, K., Hahm, E.R., Singh, S.V. (2013) *In vitro* and *in vivo* effects of phenethyl isothiocyanate treatment on vimentin protein expression in cancer cells. *Nutr. Cancer*. 65 (Suppl 1): 61-67.

Sarkar, F.H., Rahman, K.M., Li, Y. (2003) Bax translocation to mitochondria is an important event in inducing apoptotic cell death by indole-3-carbinol (I3C) treatment of breast cancer cells. *J. Nutr*. 133(7 Suppl): 2434S-2439S.

Sarkar, R., Mukherjee, S., Biswas., Roy, M.(2012) Sulphoraphane, a naturally occurring isothiocyanate induces apoptosis in breast cancer cells by targeting heat shock proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427(1): 80-85.

Sarkars, R., Mukherjee, S., Roy, M. (2013) Targeting heat shock proteins by phenethyl isothiocyanate results in cell-cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells. *Nutr. Cancer.* , 65(3): 480-93.

Sayeed, M.A., Bracci, M., Ciarapica, V., Malavolta, M., Provinciali, M., Pieragostini, E., Gaetani, S., Monaco, F., Lucarini, G., Rapisarda, V., Di Primio, R., Santarelli, L. (2018) Allyl Isothiocyanate Exhibits No Anticancer Activity in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 19(1):145 (doi: 10.3390/ijms19010145).

Scheel, C., Weinberg, R.A. (2012) Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition: Concepts and molecular links. *Semin. Cancer Biol.* 22(5-6): 396-403.

Sehrawat, A., Kim, S.H., Vogt, A., Singh, S.V. (2013) Suppression of FOXQ1 in benzyl isothiocyanate-mediated inhibition of epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 34(4): 864-873.

Sehrawat, A., Singh, S.V. (2011) Benzyl isothiocyanate inhibits epithelial-mesenchymal transition in cultured and xenografted human breast cancer cells. *Cancer Prev. Res.* 4: 1107–1117.

Sehrawat, A., Singh, S.V.(2016) Short-form RON overexpression augments benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* 55(5): 473-485.

Singh, S.V., Kim, S.H., Sehrawat, A., Arlotti, J.A., Hahm, E.R., Sakao, K., Beumer, J.H., Jankowitz, R.C., Chandra-Kuntal, K., Lee, J., Powolny, A.A., Dhir, R. (2012) Biomarkers of phenethyl isothiocyanate-mediated mammary cancer chemoprevention in a clinically relevant mouse model. *J. Natl. Cancer Inst.* 104(16): 1228-1239.

Syed Alwi, S.S., Cavell, B.E., Donlevy, A., Packham, G. (2012) Differential induction of apoptosis in human breast cancer cell lines by phenethyl isothiocyanate, a glutathione depleting agent. *Cell Stress Chaperones.* 17(5): 529-538.

Syed Alwi, S.S., Cavell, B.E., Telang, U., Morris, M.E., Parry, B.M., Packham, G. (2010) *In vivo* modulation of 4E binding protein 1 (4E-BP1) phosphorylation by watercress: a pilot study. *Br. J. Nutr.* 104(9): 1288-1296.

Tiwari, R.K., Guo, L., Bradlow, H.L., Telang, N.T., Osborne, M.P. (1994) Selective responsiveness of human breast cancer cells to indole-3-carbinol, a chemopreventive agent. *J. Natl. Cancer Inst.* 86(2): 126-131.

Tsai, S.C., Huang, W.W., Huang, W.C., Lu, C.C., Chiang, J.H., Peng, S.F., Chung, J.G., Lin, Y.H., Hsu, Y.M., Amagaya, S., Yang, J.S. (2012) ERK-modulated intrinsic signaling and G(2)/M phase arrest contribute to the induction of apoptotic death by allyl isothiocyanate in MDA-MB-468 human breast adenocarcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 41(6): 2065-2072

Velie, E.M., Schairer, C., Flood, A., He, J.P., Khattree, R., Schatzkin, A. (2005) Empirically derived dietary patterns and risk of postmenopausal breast cancer in a large prospective cohort study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 82(6):1308-1319.

Vera-Ramirez, L., Vodnala, S.K., Nini, R., Hunter, K.W., Green, J.E..(2018) Autophagy promotes the survival of dormant breast cancer cells and metastatic tumour recurrence. *Nature Communications* volume 9, Article number: 1944. *Nat Commun.* 9(1): 1944.

Warin, R., Xiao, D., Arlotti, J.A., Bommarreddy, A., Singh, S.V. (2010) Inhibition of human breast cancer xenograft growth by cruciferous vegetable constituent benzyl isothiocyanate. *Mol. Carcinog.*, 49(5): 500-507.

Wattenberg, L.W. (1966) Chemoprophylaxis of carcinogenesis: a review. *Cancer Res.* 26(7):1520-1526.

Wu, Y., Feng, X., Jin, Y., Wu, Z., Hankey, W., Paisie., Li, L., Liu, F., Barsky, S.H., Zhang, W., Ganju, R., Zou, X. (2010) A novel mechanism of indole-3-carbinol effects on breast carcinogenesis involves induction of Cdc25A degradation. *Cancer Prev. Res.*, 3(7): 818-828

[www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)

Xiao, D., Bommarreddy, A., Kim, S.H., Sehrawat, A., Hahm, E.R., Singh, S.V. (2012) Benzyl isothiocyanate causes FoxO1-mediated autophagic death in human breast cancer cells. *PLoS One.*, 7(3):e32597.

Xiao, D., Powolny, A.A., Singh, S.V. (2008) Benzyl isothiocyanate targets mitochondrial respiratory chain to trigger reactive oxygen species-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 283(44): 30151-30163.

Xiao, D., Vogel, V., Singh, S.V. (2006) Benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in human breast cancer cells is initiated by reactive oxygen species and regulated by Bax and Bak. *Mol. Cancer Ther.* 5(11): 2931-2945.

Zhang, Z., Atwell, L.L., Farris, P.E., Ho, E., & Shannon, J. (2016). Associations between cruciferous vegetable intake and selected biomarkers among women scheduled for breast biopsies. *Public Health. Nutr.*, 19(7), 1288-1295.



**TABLE.1: Glucosinolates from Brassicaceae crops, their hydrolysis products and the name of the vegetables rich in those products**

	Glucosinolates								
	Glucoraphanin		Sinigrin		Glucoiberin	Glucoerucin	Glucobrassicin	Gluconasturtiin	Glucotropaeolin
Hydrolysis products	<b>Sulforaphane (SFN)*</b>	Sulforaphane nitrile	<b>Allyl isothiocyanate (AITC)*</b>	Allyl Nitrile	<b>Iberin*</b>	<b>Erucin*</b>	<b>Indole-3carbinol (I3C)</b>	<b>Phenethyl isothiocyanate (PEITC)*</b>	<b>Benzyl isothiocyanate (BITC)*</b>
Vegetables rich in	Broccoli ( <i>B. oleracea</i> )		Kale, cabbage, Brussels sprouts, cauliflower ( <i>B. oleracea</i> )		Kale, cabbage, cauliflower ( <i>B. oleracea</i> )	Cabbage, broccoli, kohlrabi, Chinese cabbage ( <i>B. oleracea</i> ), arugula or rocket salad ( <i>Eruca vesicaria</i> )	Kale, cabbage, broccoli, Brussels sprouts, cauliflower ( <i>B. oleracea</i> )	Water cress ( <i>Nasturtium officinalis</i> ), white mustard ( <i>Sinapis alba</i> ), turnips ( <i>B. rapa</i> )	Indian cress or garden nasturtium ( <i>Tropaeolum majus</i> )

Glucosinolates have beneficial effects on cancer prevention and treatment. Single bioactive components, after their hydrolysis, are classified into isothiocyanates (\*), nitrile and indole compounds. Crucifer crops where these compounds are abundant are detailed. Compounds highlighted in bold in will be commented in the text.

**Table 2: Epigenetic mechanisms in vivo and in vitro**

<b>IN VITRO</b>			
MOLECULE	EFFECT	CELL TYPE	Ref.
SFN	↓ DNMT1, DNMT3B, RNA methylation, miR-23b, miR-92b, miR-381 and miR-382	MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3	Lewinska et al., 2017
SFN	↑ PTEN, RAR $\beta$ 2, CAV1, ER $\alpha$ , IL6 ↓ hTERT	MDA-MB-231	Gianfredi et al., 2017
SFN	↓ hTERT	MDA-MB-231 and MCF-7	Meeran et al., 2010
I3C	↓ COX-2	MCF-7	Degner et al., 2009
PEITC	↑ alpha-tubulin	MDA-MB-231 and MCF-7	Cang et al., 2014
<b>IN VIVO</b>			
DIET	EFFECT	ANIMAL SPECIES	Ref.
Prenatal/maternal broccoli sprout dietary treatment	↑ P53, p16, hTERT, c-Myc ↓ HDAC1	Two transgenic mouse models C3(1)-SV40 Tag (FVB-Tg(C3-1-125 TAg)cJeg/JegJ) (SV40) and FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mu (Her2/neu)	Li et al., 2018

Abbreviations: ↑: enhanced expression or protein, ↓: reduced expression or protein level, SFN: sulforaphane, I3C: Indole-3carbinol, PEITC: Phenethyl isothiocyanate, PTEN: phosphatase and tensin homologue, RAR $\beta$ 2: retinoic acid receptor beta 2, hTERT: human telomerase reverse transcriptase, ER $\alpha$ : estrogen receptor  $\alpha$ , CAV1: caveolin 1, IL-6: interleukin 6, DNMT1: DNA methyltransferase 1, DNMT3B: DNA methyltransferase 3B, cox-2: cyclooxygenase-2, miR-23b, miR-92b, miR-381 and miR-382: MicroRNAs

**Table 3: I3C effects on cell cycle**

	MDA-MB-468	MDA-MB-231	MCF-7	HBL-100	MCF10A	Ref
IGFR-1			↓			Marconett et al., 2012
IRS1			↓			Marconett et al., 2012
ER $\alpha$			↓			Marconett et al., 2012 Tiwari et al., 1994
hTERT			↓			Marconett et al., 2011
EGFR	↓ (86+/-9%)	↓ (31(+/-8%)	↓ (44+/-22%)	↓ (30+/-12%)		Moiseeva et al., 2007 Firestone et al., 2003
P21-cip1		↑	↑			Moiseeva et al., 2007 Cover et al., 1998 Wu et al. 2010
CyclinD1		↓	↓			Moiseeva et al., 2007
CyclinE			↑(not significant) ↑			Moiseeva et al., 2007 Cram et al. 2001
P27-Kip1		↑				Moiseeva et al., 2007 Cover et al., 1998
CDK6		↓	↓			Moiseeva et al., 2007 Firestone et al., 2003 Cover et al., 1998 Cram et al., 2001
CDK2			↓			Garcia et al, 2005
cDc25A	↓	↓	↓			Wu et al., 2010
IFN $\gamma$			↑			Chatterji et al., 2004
NF-KB		↓				Aronchik et al., 2010
Elastase		↓				Aronchik et al., 2010 Nguyen et al. 2008
CYP1A		≈	↑			Ociepa-Zawal et al., 2007 Tiwari et al., 1994 Ashok et al., 2001
CYP1B			↑			Ociepa-Zawal et al., 2007
CYP1A/CYP1B			↑↑			Ociepa-Zawal et al., 2007
AhR			↑			Ociepa-Zawal et al., 2007
P53	↑	↑	≈		↑	Brew et al., 2006

Abbreviations: ↑ enhanced expression or protein, ↓ reduced expression or protein level, ≈ : no change in expression or protein level, I3C: Indole-3carbinol, IGFR-1: Insulin-like Growth Factor Receptor-1, IRS1: Insulin Receptor Substrate-1, ER $\alpha$ : estrogen receptor  $\alpha$ , hTERT: human telomerase reverse transcriptase, p21-cip1: cyclin-dependent kinase inhibitor 1, p27-Kip: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, CDK6: Cell division protein kinase 6, CDK2: cell division protein Kinase 2, cDc25A: Cell division cycle 25 homolog A, IFN $\gamma$ : Interferon gamma, NF-KB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, CYP1A: Cytochrome p401A, CYP1B: Cytochrome p450 1B, AhR: Aryl hidrocarbon receptor, P53: protein p53.



**Table 4: Effects of ITCs in EMT.**

ITCs	Factor	Action	In vitro	In vivo	Reference
SFN	vimentin	↓	MDA-MB-231		Hunakova et al., 2009
SFN	MMP7	↓	MDA-MB-231		Hunakova et al., 2009
SFN	MMP14	↓	MDA-MB-231		Hunakova et al., 2009
SFN	MMP2	↓	MDA-MB-231		Bao et al., 2016
SFN	MMP9	↓	MDA-MB-231		Bao et al., 2016
SFN	leptin	↓	MDA-MB-231 and MCF7		Kim et al., 2011
I3C	E-cadherin	↑	T47-D, MCF7 and MDA-MB 468		Meng et al., 2000a
I3C	PTEN	↑	T47-D, MCF7 and MDA-MB 468		Meng et al., 2000b
I3C	BRCA1	↑	T47-D, MCF7 and MDA-MB 468		Meng et al., 2000b
I3C	MUC1	↓	MCF7 and MDA-MB-468		Lee et al., 2004
PEITC	vimentin	↑	MDA-MB-231		Sakao et al., 2013
PEITC	vimentin	↓		MMTV- <i>neu</i> mice	Sakao et al., 2013
BITC	E-cadherin	↑	MDA-MB-231 and SUM159		Sehrawat and Singh, 2011
BITC	vimentin	↓	MDA-MB-231 and SUM159		Sehrawat and Singh, 2011
BITC	snail	↓	MDA-MB-231 and SUM159		Sehrawat and Singh, 2011
BITC	E-cadherin	↑	MCF7		Sehrawat and Singh, 2011
BITC	E-cadherin	↑		female athymic mice	Sehrawat and Singh, 2011
BITC	vimentin	↓		female athymic mice	Sehrawat and Singh, 2011
BITC	uPA and uPAR	↓	MDA-MB-231, SUM159 and MDA-MB-468		Sehrawat et al., 2013
BITC	FOXQ1	↓	MDA-MB-231, SUM159 and MDA-MB-468		Sehrawat et al., 2013
BITC	MMP2	↓		female BALB/c mice	Kim et al., 2011B
BITC	MMP9	↓		female BALB/c mice	Kim et al., 2011B
BITC	leptin	↓	MDA-MB-231 and MCF7		Kim et al., 2011

Abbreviations: ↑ enhanced expression or protein, ↓ reduced expression or protein level, MMP: Metalloproteinases, uPA: urokinase-type plasminogen activator, uPAR: urokinase-type plasminogen activator receptor, PTEN: phosphatase and tensin homolog gene, BRCA1: breast cancer 1 gene, FOXQ1: forkhead box Q1 protein.

